

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS
INSTRUMENTAL



DESARROLLO DE ELECTRODOS MODIFICADOS CON
MATERIALES NANOESTRUCTURADOS Y SU ACOPLAMIENTO EN
TÉCNICAS DE FLUJO CONSTANTE. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE
COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN VINOS.

MARTA MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

Tesis Doctoral
Madrid, Octubre de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS
INSTRUMENTAL



DESARROLLO DE ELECTRODOS MODIFICADOS CON
MATERIALES NANOESTRUCTURADOS Y SU
ACOPLAMIENTO EN TÉCNICAS DE FLUJO CONSTANTE.
APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE COMPUESTOS
POLIFENÓLICOS EN VINOS.

Marta Martínez Fernández

Tesis para optar al grado de Doctora en Química
Madrid, Octubre de 2014

AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el momento que toda persona desea cuando hace una Tesis, escribir los agradecimientos significa que uno ya ha llegado al final de un largo y duro camino. Un largo y duro camino que todos los que trabajamos en esto disfrutamos y el cual no sería posible realizar sin la ayuda, directa e indirecta, de ciertas personas. Por ello me gustaría agradecer a todas aquellas que de una manera u otra han contribuido a que hoy me encuentre escribiendo esta hoja.

En primer lugar debo agradecer al Dr. Manuel Chicharro y al Dr. Alberto Sánchez, su dedicación a este trabajo y a la redacción de esta Tesis. Pero, en especial, me gustaría agradecerles la confianza depositada en mí para darme la oportunidad de hacer la Tesis en su grupo de investigación.

Es evidente que una parte fundamental de este trabajo no se podría haber realizado sin financiación y por ello agradezco al Ministerio de Economía y Competitividad su ayuda con la concesión de la beca FPI BES-2010-037292 asociada al proyecto CTQ2009-09791.

Quisiera expresar mi agradecimiento al Grupo de Química Analítica de Productos Naturales de la Universidad del País Vasco por su disposición para recibarnos, explicarnos y orientarnos sobre el conjunto de técnicas quimiométricas empleadas en la elaboración del Apartado IV.3.

Me gustaría dedicar este párrafo al Dr. Gustavo Rivas, la Dra. Nancy Ferreyra y a todos los chicos y chicas que pertenecen al grupo de investigación que dirige el Dr. Gustavo en el Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba, en la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Me habéis hecho sentir como en casa durante los tres meses que he estado de estancia en vuestro grupo. Sois una gente excepcional dentro y fuera del laboratorio y creo que cualquier cosa que pueda decir de vosotros se va a quedar pequeña...

Además de los directores de una Tesis, siempre hay compañeros en los grupos que son de gran ayuda, incluso más de lo que ellos mismos piensan. Por ello me gustaría expresar mi agradecimiento a la Dra. Esperanza Bermejo y en especial a la Dra. Mónica Moreno, gracias, muchas gracias por preocuparos por mí en lo laboral y en lo personal, incluso a unos cuantos kilómetros de distancia.

A los chicos que han pasado de manera temporal por el laboratorio. Desde el primero hasta el último, David, Antonio, José María, Gonzalo, Mario y Javi, es tremendamente agradable vuestra compañía, os deseo muchísima suerte para el futuro.

A todos mis compañeros de departamento, compañeros de comida con los que compartir risas y conversaciones de todo tipo, ¡cómo voy a echar de menos esa pequeña salita del microondas!

Autónomos madrileños... ya estamos aquí, ya llegó el fin y aunque (no os voy a engañar) terminar esto es genial, aun no me hago a la idea de no estar ahí con vosotros durante este invierno. Sinceramente, sabéis que sin vuestros ánimos, sin esos cafés (guiño, guiño), esas cañas y esos chamanes, esta Tesis no habría sido ni parecida. Quiero daros todo mi ánimo para las vuestras, el camino es duro pero la satisfacción al final lo compensa todo. Espero vuestro momento, sé que lo haréis genial y que yo estaré ahí para verlo. Os quiero mucho, sois unos genios.

Cambiarse de ciudad es duro al principio y maravilloso después, se conoce mucha gente pero solo unos pocos se guardan en el corazón. Moncho, gracias por hacer el principio muy poco duro, tú y Abraham habéis sido un importante apoyo en el comienzo de esta etapa. Carmen, Carlos, Paula, Laura y Magalí, todos los que aquí nombro sois mi familia madrileña, con vosotros he vivido grandes momentos y guardo la esperanza de repetirlos en un futuro.

A vosotras, Fuencarralinas, que puedo deciros, sois las mejores compañeras de piso, de risa, de lágrimas y las mejores hermanas que se puede tener. Vuestros ánimos constantes, vuestro apoyo incondicional, las largas charlas en el salón, las comidas de Mari, la cervecita con Yumi esperando la comida, las meriendas de Inma, las visitas alocadas de Alba, los desayunos de fin de semana con Marisa, las cañas distraídas... y así podría seguir enumerando un sinfín de cosas que os hacen únicas y especiales, sois un equipazo.

Os meus compañeiros do laboratorio de Santiago, non me olvido de vós porque non sodes compañeiros, sodes amigos. Grazas por estar ahí a pesar dos anos, pola axuda na distancia cando aparecen dúbidas e polos ánimos cando as cousas non saen ben. Mosqueteiras non sabedes o difícil que é un laboratorio sen a vosa presenza.

Queridos amigos, os de sempre, os que me coñecen máis que a miña propia familia... non sei como podo agradecer nunhas liñas a vosa amizade. Grazas por todo, por facer que a distancia non sexa un problema, por facer dunha fin de semán calqueira unha festa, polos reencontros, os apoios e por estar ahí sempre. Sodes impresionantes.

Roi, cando comecei a escribir isto pensei que este sería o parágrafo máis sinxelo, e agora doume conta de que é o máis difícil. Difícil porque non sei como vou resumir nunhas poucas liñas o que eres para mín, necesitaría outros douscentos folios para agradecer o teu apoio incondicional, a seiscentos ou dez mil kilómetros, por facelo todo tan fácil, por axudarme sempre, incluso facendo as táboas da Tese, por estar tan orgulloso de mín coma eu de tí... Creo que non hai nada que eu poida escribir que esté á altura do que significas para mín. Quérote moito, eres o mellor que me pasou na vida.

A miña familia, esos dez de sempre, penso que só podo decir grazas unha e mil veces por estar ahí sempre, pola vosa preocupación alí onde me encuentre, por facer de tíos, primos, país, nais ou irmáns sen criterio. Quérovos moito. Cris, eu non coñecería Madrid da mesma maneira se non fora por ti, grazas.

Andrea e Riqui, estou moi orgullosa dos dous, de todo o que conseguistades na vida, da vosa forza e constancia, do voso humor e en especial da vosa valentía e capacidade de superación. Sodes o mellor exemplo que unha irmá pequena pode ter e non imaxinades canto vos quero. Agora que imos ser un máis esperamos con moita ilusión a Nicolás, vai ter unha familia única e especial.

Mamá, Papá, esta Tese é vosa, porque sen o voso exemplo, o voso traballo, o duro esforzo, a axuda, e en especial a vosa preocupación e adicación a nós, ningún dos tres sería o que somos. Papá, eres o mellor exemplo de que o traballo tradúcese en éxito e de que sen risco nunca hai vitoria; Mamá de ti aprendín que ao mal tempo sempre hai que poñer boa cara, eres unha persoa cunha forza excepcional que nunca entenderei de onde sae. Non me cansaría de agradecer unha e mil veces a vosa paciencia para escoitarme e animarme aínda que fose por teléfono, a vosa axuda constante e especialmente na miña estancia en Arxentina, a vosa disposición sempre e unha lista de cousas que nunca remataría. Sodes todo para mín e quérovos moitísimo.

LONGA NOITE DE PEDRA

O teito é de pedra.
De pedra son os muros
i as tebras.
De pedra o chan
i as reixas.
As portas,
as cadeas,
o aire,
as fenestras,
as olladas,
son de pedra.
Os corazóns dos homes
Que ao lonxe espreitan,
feitos están
tamén
de pedra.
I eu, morrendo
nesta longa noite
de pedra.

Celso Emilio Ferreiro, 1962

A mis padres

ACRÓNIMOS

- ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)
- ANN: redes neuronales artificiales
- CE: electroforesis capilar
- CGE: electroforesis capilar en geles
- CITP: isoelectroenfoque capilar
- CITP: isotacoforesis capilar
- CNT: nanotubos de carbono
- CPE: electrodo de pasta de carbono
- CV: voltamperometría cíclica
- CV%: coeficiente de variación
- CZE: electroforesis capilar en zona libre
- DAD: detector de matriz de diodos
- DME: electrodo de gota de mercurio
- DMPD: N,N'-dimetil-*p*-fenilendiamina
- DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidracilo
- DPV: voltamperometría diferencial de pulsos
- DWCNT: nanotubos de carbono de pared doble
- ECC: electrocromatografía capilar
- ESI: ionización por electrospray
- EtOH: etanol
- FIA: análisis por inyección en flujo
- FRAP: capacidad antioxidante total del plasma
- GC: cromatografía de gases
- GCE: electrodo de *glassy carbon*
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia
- IC: índice de color
- IE: índice electroquímico
- IFC: índice Folin-Ciocalteu
- IPT: índice de polifenoles totales
- KNN: método de los K vecinos más próximos
- LC: límite de cuantificación
- LD: límite de detección
- LDA: análisis lineal discriminante
- LDL: colesterol de baja densidad
- LLM: máquina de aprendizaje lineal
- MEKC: cromatografía electrocinética capilar micelar
- MeOH: metanol
- MS: espectrometría de masas
- MWCNT: nanotubos de carbono de pared múltiple
- OCH₃: grupo O-metilo
- OGlu: O-glucósido
- OH: grupo hidroxilo

- OIV: oficina internacional de la viña y el vino
- ORAC: capacidad de absorción de radicales oxígeno
- PC: componente principal
- PCA: análisis de componentes principales
- PCR: regresión en componentes principales
- PEI: polietilenimina
- PHys: polihistidina
- PLS: regresión por mínimos cuadrados parciales
- PLys: polilisina
- QDA: análisis discriminante cuadrático
- QLM: máquina de aprendizaje cuadrático
- RDA: análisis discriminante regularizado
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- RSD: desviación estándar relativa
- SIMCA: soft independent models of class analogy
- SPE: electrodo serigrafiado (screen-printed electrode)
- SWCNT: nanotubos de carbono de pared simple
- TEAC: capacidad antioxidante equivalente al Trolox
- TOL: tolerancia
- UPLC: cromatografía líquida de ultra eficacia
- VIF: factor de inflación de la varianza

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS: DEFINICIÓN, PROPIEDADES Y CLASIFICACIÓN	3
I.2. COMPUESTOS FENÓLICOS EN VINO	4
I.2.1 Ácidos fenólicos	10
I.2.2. Estilbenos	11
I.2.3. Flavanoles, flavonoles y antocianidinas	11
I.2.4. Taninos condensados y taninos hidrolizables	12
I.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN VINOS	12
I.3.1. Actividad antioxidante	13
I.3.2. Compuestos fenólicos totales	13
I.3.3. Separación y detección de compuestos fenólicos	24
I.4. BIBLIOGRAFÍA	39
II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	51
II.1. OBJETIVOS	53
II.2. PLAN DE TRABAJO	54
III. PARTE EXPERIMENTAL	57
III.1. APARATOS Y MATERIAL	59
III.1.1. Aparatos	59
III.1.2. Electrodo	59
III.1.3. Material para la modificación de electrodos	60
III.1.4. Material para el pulido de electrodos	60
III.1.5. Columna capilar	60
III.1.6. Tratamiento de muestras	60
III.2. REACTIVOS, MUESTRAS, PREPARACIÓN DISOLUCIONES Y MUESTRAS	60
III.2.1. Reactivos	60
III.2.2. Muestras de vino	61
III.2.3. Preparación de disoluciones y muestras	63
III.3. PROCEDIMIENTOS	64
III.3.1. PREPARACIÓN DE ELECTRODOS Y DISPERSIONES	64
III.3.1.1. Pretratamiento de los electrodos de trabajo	64
III.3.1.2. Preparación de dispersiones de nanotubos de carbono	64
III.3.1.3. Modificación de electrodos con nanotubos de carbono	65
III.3.2. ESTUDIOS VOLTAMPEROMÉTRICOS DE POLIFENOLES	65

III.3.3. EXPERIMENTOS MEDIANTE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA.....	65
III.3.4. EXPERIMENTOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA.....	65
III.3.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS VINOS: pH, ACIDEZ TOTAL, CONTENIDO EN SULFITOS.....	66
III.3.5.1. pH.....	66
III.3.5.2. Acidez total.....	66
III.3.5.3. Contenido en sulfitos.....	67
III.3.6. ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	68
III.3.6.1. Índice Folin-Ciocalteu.....	68
III.3.6.2. Absorbancia a 280 nm.....	68
III.3.6.3. Ensayo de color.....	68
III.3.6.4. Ensayo del DMACA para flavanoles.....	68
III.3.6.5. Ensayo del aluminio para flavonoides.....	69
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
IV.1. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS UTILIZANDO UN SISTEMA FIA CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA.....	73
IV.1.1. INTRODUCCIÓN: TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS, DESCRIPCIÓN DE UN SISTEMA FIA Y ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO	75
IV.1.1.1. QUÍMICA ELECTROANALÍTICA.....	77
IV.1.1.2. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	79
IV.1.1.3. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA.....	82
IV.1.1.3.1. Sistema de inyección en flujo (FIA).....	82
IV.1.1.3.2. Detección amperométrica.....	84
IV.1.1.3.3. Celda electroquímica.....	85
IV.1.1.4. ELECTRODO DE TRABAJO.....	86
IV.1.1.4.1. Electrodo de glassy carbon (GCE).....	86
IV.1.1.4.2. Electrodos basados en nanotubos de carbono.....	87
IV.1.2. RESULTADOS: OPTIMIZACIÓN DE LA DISPERSIÓN Y CONDICIONES DEL ELECTROLITO SOPORTE.....	91
IV.1.2.1. DISPERSIONES DE NANOTUBOS DE CARBONO EN POLÍMEROS.....	93
IV.1.2.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO EN PRESENCIA DE POLIFENOLES.....	98
IV.1.2.2.1. Estudios voltamperométricos.....	98
IV.1.2.2.2. Estabilidad de la señal amperométrica.....	102

IV.1.2.3. pH DE TRABAJO	105
IV.1.2.4. CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN TAMPÓN	110
IV.1.3. RESULTADOS: ESTUDIOS EN UN SISTEMA FIA	115
IV.1.3.1. ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DEL FLUJO DE TRABAJO	117
IV.1.3.2. ESTUDIO DEL POTENCIAL DE TRABAJO	119
IV.1.3.3. ESTABILIDAD DEL ELECTRODO	120
IV.1.3.4. ESTUDIOS DE CONCENTRACIÓN DE ANALITO: INTERVALO LINEAL, LÍMITES DE DETECCIÓN (LD) Y CUANTIFICACIÓN (LC)	124
IV.1.3.5. ESTUDIOS DE EXACTITUD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO	126
IV.1.3.6. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	127
IV.1.3.7. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN VINOS TINTOS Y BLANCOS	127
IV.1.3.8. ESTUDIOS DE CORRELACIÓN DE LOS ÍNDICES ELECTROQUÍMICOS Y ESPECTROFOTOMÉTRICOS	129
IV.1.4. BIBLIOGRAFÍA	133
IV.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS UTILIZANDO ELECTROFORESIS CAPILAR	139
IV.2.1. INTRODUCCIÓN: FUNDAMENTOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR	141
IV.2.1.1. ELECTROFORESIS CAPILAR	143
IV.2.1.1.1. Electromigración	144
IV.2.1.1.2. Electroósmosis	146
IV.2.1.1.3. Orden de migración en procesos de electroforesis capilar de zona simple	148
IV.2.1.1.4. Efecto Joule	149
IV.2.1.1.5. Tiempo de migración	150
IV.2.1.1.6. Eficacia	150
IV.2.1.1.7. Resolución	151
IV.2.1.1.8. Selectividad	152
IV.2.1.2. INTRODUCCIÓN DE MUESTRA	152
IV.2.1.2.1. Introducción electrocinética	152
IV.2.1.2.2. Introducción hidrodinámica	153
IV.2.1.3. MODOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR	153
IV.2.1.3.1. Electroforesis capilar en zona libre (CZE)	154
IV.2.1.3.2. Cromatografía electrocinética capilar micelar (MEKC)	154
IV.2.1.3.3. Electroforesis capilar en geles (CGE)	154
IV.2.1.3.4. Isotacoforesis capilar (CITP)	155
IV.2.1.3.5. Isoelectroenfoque capilar (CIEF)	155

IV.2.1.3.6. Electro cromatografía capilar (ECC)	155
IV.2.1.4. SISTEMAS DE DETECCIÓN	155
IV.2.2. RESULTADOS: DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA Y DETECCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS.....	161
IV.2.2.1. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN	163
IV.2.2.1.1. Estudio del pH y concentración de la disolución reguladora	164
IV.2.2.1.2. Estudio del tiempo de introducción de muestra	169
IV.2.2.1.3. Estudio de la concentración de la disolución tampón	170
IV.2.2.1.4. Estudio de la presencia de modificadores orgánicos.....	172
IV.2.2.1.5. Estudio del voltaje de separación.....	176
IV.2.2.2. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE DETECCIÓN	178
IV.2.2.3. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.....	180
IV.2.2.3.1. Evolución de la señal con la concentración de polifenoles: intervalo de respuesta lineal	181
IV.2.2.3.2. Evaluación de los límites de detección y cuantificación.....	181
IV.2.2.3.3. Estudio de la exactitud del método	182
IV.2.2.3.4. Estudio de la precisión: reproducibilidad, repetitividad.....	183
IV.2.3. BIBLIOGRAFÍA	187
IV.3. CLASIFICACIÓN DE VINOS BLANCOS ESPAÑOLES A PARTIR DEL ÍNDICE ELECTROQUÍMICO Y PERFIL ELECTROFORÉTICO. APLICACIÓN DE TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS	193
IV.3.1. INTRODUCCIÓN: TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO.....	195
IV.3.1.1. INTRODUCCIÓN A LA QUIMIOMETRÍA	197
IV.3.1.2. EXPLORACIÓN DE DATOS	199
IV.3.1.2.1. Técnicas de preprocesado: escalado	199
IV.3.1.2.2. Técnicas de aprendizaje no supervisado: Análisis de clúster	200
IV.3.1.3. TÉCNICAS DE REDUCCIÓN DE LA DIMENSIONALIDAD: ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA).....	202
IV.3.1.4. TÉCNICAS DE RECONOCIMIENTO DE MODELOS SUPERVISADAS	203
IV.3.1.4.1. Análisis Lineal Discriminante (LDA)	205
IV.3.1.4.2. Análisis de los K vecinos más próximos (KNN)	206
IV.3.1.4.3. Métodos de funciones de potencial	207
IV.3.1.4.4. Método SIMCA	207
IV.3.1.4.5. Redes Neuronales Artificiales (ANN).....	209
IV.3.1.4.6. Análisis por PLS	211
IV.3.2. RESULTADOS: CLASIFICACIÓN DE VINOS POR SU ÍNDICE ELECTROQUÍMICO	213

IV.3.2.1. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	215
IV.3.2.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	216
IV.3.2.3. RESULTADOS	216
IV.3.2.3.1. Primer estudio	216
IV.3.2.3.2. Segundo estudio	224
IV.3.3. RESULTADOS: CLASIFICACIÓN DE VINOS POR SU PERFIL ELECTROFORÉTICO	237
IV.3.3.1. INTRODUCCIÓN	239
IV.3.3.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	239
IV.3.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	240
IV.3.3.2.1. Análisis de clúster	246
IV.3.3.2.2. Análisis de componentes principales.....	247
IV.3.3.2.3. Análisis discriminante.....	252
IV.3.4. BIBLIOGRAFÍA	255
V. CONCLUSIONES	261
VI. PUBLICACIONES DERIVADAS.....	267

I. INTRODUCCIÓN

I.1. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS: DEFINICIÓN, PROPIEDADES Y CLASIFICACIÓN

Los polifenoles son un grupo de sustancias, habitualmente de origen vegetal, que tienen un gran interés porque muchos de ellos presentan propiedades antioxidantes. La mayoría de estos compuestos son producidos en procesos metabólicos que se desarrollan en las plantas y también como respuesta de éstas a estímulos externos. Principalmente se generan a partir de aminoácidos y carbohidratos en la ruta metabólica del siquimato y en la del acetato, acumulándose en los diversos tejidos vegetales: hojas, frutos o semillas. Los polifenoles juegan un papel importante en plantas, alimentos y seres humanos ya que presentan una doble funcionalidad: actividad biológica y celular¹.

En las plantas son agentes protectores ante la radiación UV así como responsables del crecimiento y reproducción de las mismas. Además son componentes básicos de sus pigmentos, aromas y sabores².

Están presentes en frutas, verduras y cereales, así como bebidas procedentes de origen vegetal como por ejemplo zumos de frutas, té, vino, cerveza o café. En los alimentos los compuestos fenólicos protegen de la oxidación, favoreciendo su estabilidad, y son responsables de sus características organolépticas; por ejemplo en las bebidas de su amargura y astringencia³.

En los últimos años este grupo de sustancias ha despertado el interés de multitud de investigaciones debido a las propiedades beneficiosas que aportan a la salud. La llamada "paradoja francesa" supone el punto de partida por demostrar que, a pesar de que en Francia el consumo de grasas de origen animal en la dieta es elevado, el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares es bajo. Esto se ha relacionado con el consumo de vino tinto por la población objeto de estudio, bebida con un alto contenido en compuestos fenólicos⁴. A partir de ese momento, son muchas las investigaciones que indican que estas sustancias actúan como agentes antioxidantes de las células, es decir, captadores de radicales libres de *especies reactivas de oxígeno* (ROS). Las ROS producen daños oxidativos en las células, los cuales están relacionados con procesos degenerativos celulares responsables del desarrollo de enfermedades crónicas y cáncer. El mecanismo de actuación de los compuestos fenólicos frente a estas especies se debe a sus propiedades redox⁵, ya que los grupos catecol (1,2-hidroxibenceno) y 1,4-hidroquinona que poseen en sus estructuras dan lugar al oxidarse por las ROS, en el primer caso a aniones semi-quinona muy estables y, en el segundo a un radical fenoxilo cuya carga está estabilizada por el átomo de oxígeno más próximo⁶. Por todo esto son sustancias cuya presencia en la dieta se relaciona con la prevención de procesos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer⁷⁻⁹. Además presentan propiedades antialérgicas y antimicrobianas por lo que se les relaciona con la salud dental, ya que hay estudios que indican que previenen el cáncer bucal, las enfermedades periodontales y caries¹⁰. Es importante reseñar que los beneficios que pueden aportar estas sustancias a la salud de las personas vienen determinados por su biodisponibilidad, puesto que no todos estos compuestos se absorben de la misma forma y muchos son metabolizados por las enzimas hepáticas y la flora intestinal.

Existen diversas maneras de clasificar los polifenoles, siendo una de las más habituales su agrupación basada en la estructura de un esqueleto fenólico característico para cada grupo al cual se unen diferentes sustituyentes². En la tabla 1 se muestra la clasificación de los compuestos fenólicos empleando este criterio:

Tabla 1. Clasificación de compuestos fenólicos²

COMPUESTOS FENÓLICOS		
Fenoles simples	Ácidos fenólicos	Derivados del ácido benzoico
		Derivados del ácido cinámico
	Cumarinas	
Polifenoles	Flavonoides	Flavonas
		Isoflavonas
		Flavanoles
		Flavonoles
		Antocianinas
	Taninos	Hidrolizables
		No hidrolizables
	Estilbenos	

Tanto fenoles simples como polifenoles pueden ser encontrados en tejidos vegetales como especies monoméricas o pueden formar especies más complejas por reacciones de glicosilación (por ejemplo formación de antocianinas a partir de antocianidinas¹¹) y/o polimerización (formación de procianidinas o taninos). El perfil polifenólico de las plantas es una característica específica de las mismas, por lo que estos compuestos no se distribuyen de la misma manera en las diferentes fuentes que los contienen¹². El grupo que forman los flavonoides está considerado el más importante dentro de los compuestos fenólicos y son, junto con los compuestos fenólicos simples, los que se encuentran principalmente en las plantas.

I.2. COMPUESTOS FENÓLICOS EN VINO

Existen diversos alimentos con un elevado contenido en polifenoles, en especial los frutos rojos como por ejemplo fresa, arándanos o moras. Sin embargo el té y el vino constituyen las fuentes más importantes en la dieta humana debido a su elevado consumo.

La calidad de los vinos blancos y tintos producidos en España hace que, junto con Francia e Italia, sean los principales países productores y exportadores de este producto. La industria vitivinícola genera especial interés debido a la cultura, tradición y multitud de propiedades beneficiosas que se le han atribuido al vino a lo largo de sus miles de años de historia. Son varios los investigadores que aseguran que el consumo moderado de vino está relacionado con la reducción del riesgo de padecer cáncer y enfermedades cardiovasculares¹³⁻¹⁸. Estos beneficios han sido atribuidos a la actividad antioxidante del vino, la cual está directamente relacionada con la concentración de compuestos fenólicos. Esta concentración y el tipo de polifenoles varía en función de las distintas variables del proceso de producción del vino: tipo de uva (tinta o blanca y sus diferentes variedades), proceso de maduración, suelo donde se cultiva, el clima y las diferentes prácticas enológicas. Además de sus propiedades antioxidantes, los compuestos fenólicos están relacionados directamente con las características organolépticas del vino, siendo los principales responsables de su sabor, aroma, astringencia o color^{19, 20}. Procedimientos tales como el prensado de la uva, maceración en vinos tintos, clarificación usando albúmina o gelatina, fermentación o posterior envejecimiento en bodega influyen directamente en estas cualidades²¹. En particular durante el proceso de

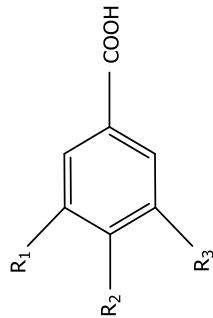
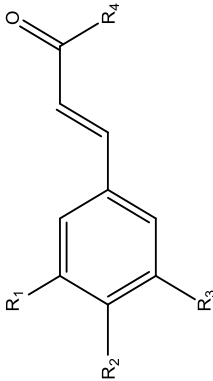
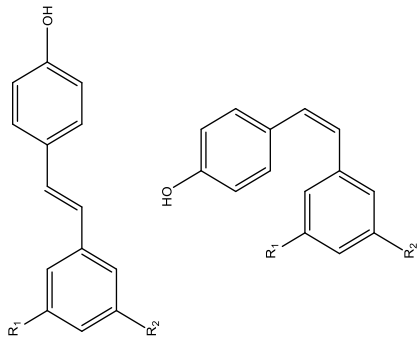
envejecimiento, se ha demostrado que suceden una serie de reacciones que dan lugar a cambios en la composición química de los vinos y, como consecuencia, en sus características organolépticas que derivan en una mejora de su calidad²².

Los grupos de polifenoles presentes habitualmente en vinos son:

- *Derivados del ácido benzoico*: ácidos *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico, gálico y sirínico.
- *Derivados del ácido cinámico*: ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, caftárico y cutárico.
- *Grupo de los estilbenos*: *t*-resveratrol, *t*-piceida y sus isómeros *cis*.
- *Grupo de los flavonoles*: Kaempferol, quercetina, miricetina, isorhamnetina.
- *Grupo de los flavanoles*: (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina, (-)-epicatequin galato, (-)-epigalocatequin galato.
- *Grupo de las antocianidinas*: pelargonidina, cianidina, delfinidina, petunidina, malvidina.
- *Grupo de taninos hidrolizables*: ácidos tánicos, ácido elágico, procianidinas.

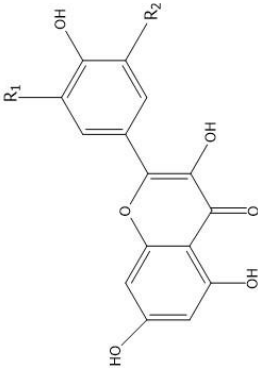
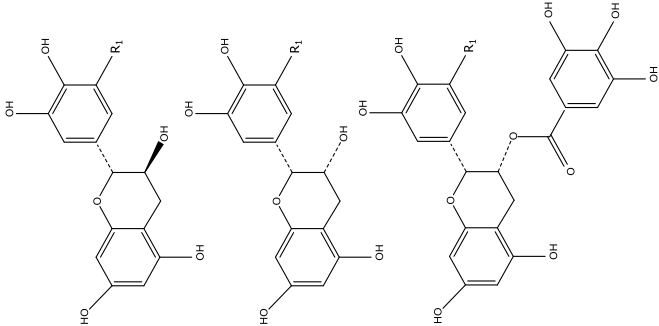
En la tabla 2 se muestran las estructuras de estos grupos de compuestos fenólicos:

Tabla 2. Estructuras de los principales grupos de compuestos fenólicos presentes en vinos

Estructura	Sustituyentes				Compuestos
	R₁ H H OH OCH ₃ OH OCH ₃	R₂ H OH OH OH OH OH	R₃ H H H H OH OCH ₃		Derivados del ácido benzoico Ácido Benzoico Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico Ácido protocatecuico Ácido vanílico Ácido gálico Ácido gentísico
	R₁ H H OH OCH ₃ OCH ₃ OH H	R₂ H OH OH OH OH OH OH	R₃ H H H H H H H	R₄ OH OH OH OH OH * **	Derivados del ácido cinámico Ácido cinámico Ácido <i>p</i> -cumárico Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido sinápico Ácido caftárico Ácido cutárico
	R₁ OH OH OH R₁ OH OH	R₂ OH OH O-Glu R₂ OH O-Glu			Estilbenos <i>trans</i> -resveratrol <i>trans</i> -piceida <i>cis</i> -resveratrol <i>cis</i> -piceida

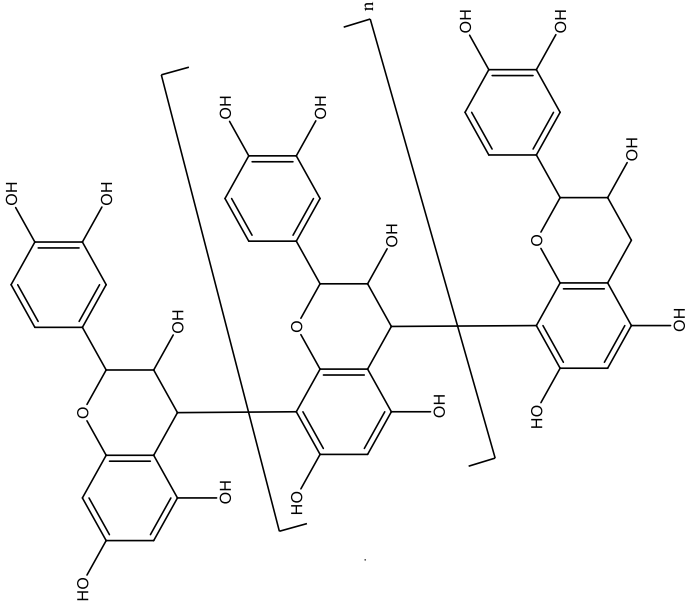
*OH(COOH)CHOHCOOH
**OCH(COOH)CHOHCOOH

Tabla 2. Estructuras de los principales grupos de compuestos fenólicos presentes en vinos

Estructura	Sustituyentes			Compuestos
	R₁ H OH OH OCH ₃	R₂ H H OH H		Flavonoles Kaempferol Quercetina Miricetina Isohammetina
	R₁ H OH			Flavanoles (+)-Catequina (+)-Galocatequina (-)-Epicatequina (-)-Epigallocatequina (-)-Epicatequin galato (-)-Epigallocatequin galato

31

Tabla 2. Estructuras de los principales grupos de compuestos fenólicos presentes en vinos

Estructura	Sustituyentes	Compuestos
		Procianidinas

Las estructuras mostradas en la Tabla 2 son las estructuras básicas precursoras de multitud de moléculas diferentes que pueden formarse por condensación, glucosilación o polimerización^{23, 24}. Esto hace del vino una muestra compleja con una composición de polifenoles variable, en un intervalo de concentraciones diferente entre vinos tintos y blancos y cuyos valores se encuentran resumidos en la tabla 3²⁵⁻³⁰.

Tabla 3. Intervalos de concentración de compuestos fenólicos en vinos

Compuesto	Vino blanco / mg·L ⁻¹	Vino tinto/ mg·L ⁻¹
Ácido gálico	1-30	2-500
Ácido protocatecuico	0-3	1-10
Ácido siríngico	0-1	0-50
Ácido vanílico	0-8	0-40
Ácido cafeico	0-6	2-40
Ácido ferúlico	1-20	0-2
Ácido <i>p</i> -cumárico	5-15	5-40
Ácido caftárico	3-300	10-200
Ácido cutárico	10-50	5-70
Ácido clorogénico	-	0-4
Tirosol	0-10	0-15
Resveratrol	0-6	1-40
Catequina	0-15	20-300
Epicatequina	0-10	10-200
Quercetina	0-20 ^a	5-50 ^a
Kaempferol	0-3	0-8
Miricetina	0-4	0-15
Rutina	0-25	4-20
Malvidina	-	50-500 ^b
Cianidina	-	0-15 ^b
Delfinidina	-	2-70 ^b
Petunidina	-	3-80 ^b
Taninos hidrolizables	10-100	100-300
Procianidinas	100-200	1000-4000

^aIncluye quercetina libre y quercetina-3-O-glucósido^bIncluye derivados -3-O-glucósido y -3-acetilglucósido expresados como equivalentes de malvidina-3-glucósido

I.2.1 Ácidos fenólicos

Estos compuestos no suelen encontrarse libres en los vinos sino que habitualmente se presentan en forma de ésteres, particularmente en los vinos blancos. Dentro de este grupo los más comúnmente encontrados son los ácidos cutárico, caftárico y fertárico, que son los ésteres de los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico, respectivamente, formados con el ácido tartárico. Son los primeros compuestos en oxidarse y cuando esto sucede se produce la aparición de una coloración marrón en los vinos blancos^{6, 31}. Por su parte, los ácidos benzoicos son un grupo

minoritario en vinos, encontrando más frecuentemente en ellos ácido gálico en forma libre, el cual es estable al envejecimiento en barrica de los vinos tintos.

Existen diversos estudios sobre los beneficios de estos compuestos en la salud y, aunque no están demostrados "in vivo", sí se han descrito resultados positivos obtenidos "in vitro" para los estudios de su naturaleza antioxidante y protectora³². Se han descrito también otras actividades biológicas de los ácidos fenólicos, ya que se sabe que bloquean selectivamente la biosíntesis de los leucotrienos, sustancias responsables de enfermedades de base inmunológica, asma y reacciones alérgicas³³. Además el ácido cafeico y algunos de sus ésteres poseen actividad antitumoral frente al cáncer de colon^{34, 35}.

I.2.2. Estilbenos

Dentro de este grupo, el compuesto que se presenta principalmente es el resveratrol, siendo las uvas y productos derivados su fuente más importante. Durante el crecimiento de la planta, esta sustancia se desarrolla en respuesta a la radiación UV, infecciones fúngicas, y actividad de herbicidas o fungicidas³⁶. Existe en sus formas *cis* y *trans* en los vinos³⁷, sin embargo en la uva la forma *cis* no está presente y es la incidencia de luz la que da lugar al proceso de isomerización⁶. Se encuentra principalmente en la piel y semillas de la uva y su contenido en vinos tintos es superior que en vinos blancos. La razón principal de este hecho es que en los primeros, durante el proceso de fermentación están en contacto el mosto, piel y en ocasiones semillas de la uva³⁸.

Dentro de los beneficios para la salud humana, se sabe que el resveratrol previene algunos tipos de cáncer^{39, 40}, ralentiza el progreso de la enfermedad del Alzheimer debido a sus propiedades neuroprotectoras⁴¹, previene la enfermedad del Parkinson⁴² y es un protector contra la obesidad y enfermedades relacionadas⁴³.

I.2.3. Flavanoles, flavonoles y antocianidinas

Los flavonoides presentes en vinos pueden encontrarse como monómeros, oligómeros y, principalmente, polímeros. Los monómeros más representativos de cada grupo son catequina y epicatequina (flavanoles), quercetina (flavonoles) y malvidina (antocianidinas) siendo los precursores de los compuestos fenólicos condensados en los vinos, tales como los taninos, procianidinas y antocianinas⁶. Flavanoles y flavonoles se encuentran principalmente en la semilla de la uva uniéndose para formar las procianidinas, que liberan antocianidinas durante el proceso de elaboración del vino tras una hidrólisis en condiciones ácidas^{44, 45}. Además son los responsables de la coloración amarilla en las uvas blancas y de una parte del color amarillo de los vinos blancos⁴⁶. Por su parte las antocianidinas están en la piel de las uvas⁴⁷ y se unen a azúcares (principalmente glucosa) para formar las antocianinas, responsables de la coloración en los vinos tintos. Las antocianinas pueden unirse a su vez con otros flavonoides para formar otros compuestos poliméricos coloreados, particularmente durante procesos de envejecimiento de vinos⁴⁶ aportando nuevas y apreciadas características cromáticas y organolépticas. Cabe destacar que, dado que el perfil de la distribución de antocianinas en la uva es característico de cada variedad, se ha sugerido que éste puede emplearse como parámetro para distinguir y autenticar vinos.

Existen diversos estudios relativos a las propiedades beneficiosas de estos compuestos para la salud humana. Entre los compuestos presentes en el vino, se ha demostrado que algunos como la (+)-catequina, la (-)-epicatequina (isómero *cis* de la (+)-catequina), así como la quercetina y rutina, presentes en menor concentración, poseen capacidad de protección contra la oxidación del colesterol de baja densidad (LDL)⁴⁷. Las propiedades vienen determinadas por la dosis ingerida, así como por la matriz en la que se hallan, encontrándose que el etanol contribuye directamente a la absorción y puede modificar su metabolismo y excreción⁴⁸.

I.2.4. Taninos condensados y taninos hidrolizables

Son los productos de condensación y polimerización de los monómeros pertenecientes al grupo de los flavonoides (taninos condensados) y ácidos fenólicos (taninos hidrolizables) y su concentración y estructura cambia durante el proceso de elaboración y envejecimiento de los vinos. Están relacionados con características organolépticas como el "cuerpo" y "estructura", desarrollando atributos como "aterciopelados", "suaves" o "sedosos" en vinos envejecidos mientras que en un vino demasiado joven se consideran "duros", "ásperos" y "gruesos"⁴⁹. La polimerización da lugar a moléculas más grandes lo que se traduce en un incremento de la astringencia⁴⁶.

Forman parte del mecanismo defensor de las plantas y frutas contra bacterias, virus y herbívoros superiores. Cuando las bacterias atacan a una fruta segregan pectinasas y celulasas, unas enzimas encargadas de romper las paredes celulares y permitir el acceso de la bacteria al zumo. Los taninos actúan inhibiendo el mecanismo de las enzimas al inducir su agregación. Cuando la fruta inmadura es atacada por los herbívoros, los taninos inhiben las enzimas digestivas y como respuesta, en la saliva se segregan proteínas ricas en prolina, que se unen a los taninos para disminuir su actividad. Como consecuencia de esto la viscosidad de la saliva se ve reducida radicalmente y se producen cambios físicos que se reflejan en una sensación de aspereza o sequedad en la boca⁴⁹. Este fenómeno se conoce comúnmente como astringencia y es uno de los parámetros utilizado para la caracterización sensorial de un vino.

I.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN VINOS

En la actualidad el análisis de polifenoles en vinos se enfoca hacia la obtención de dos tipos de información: 1) contenido total de polifenoles; 2) contenido de polifenoles individuales. La información sobre el contenido total de polifenoles está basada en ensayos de actividad antioxidante o de polifenoles totales y se expresa como índices generales de polifenoles referidos a un polifenol característico. Generalmente este tipo de ensayos son espectrofotométricos y no son específicos. Por su parte, la información sobre polifenoles individuales está unida al empleo de técnicas de separación analíticas, como GC, HPLC o electroforesis capilar, junto a procesos de tratamiento de muestra previos, típicamente extracción y preconcentración.

I.3.1. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de un vino se relaciona con su contenido en compuestos fenólicos, porque, tal y como se ha explicado, la ingesta de los mismos aumenta la defensa antioxidante del organismo frente a las ROS, principales responsables del daño oxidativo que deriva en multitud de enfermedades de tipo crónico. Se han propuesto diferentes métodos para determinar la actividad antioxidante de estos compuestos basados en su capacidad para captar radicales libres tanto en fase acuosa como orgánica. Entre ellos se encuentra el uso del radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (comúnmente denominado test del DPPH), el ácido 2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico), (ensayo del radical ABTS*) y el N,N'-dimetil-*p*-fenilen diamina (ensayo del DMPD). Este tipo de ensayos son colorimétricos: una vez formado el radical coloreado correspondiente, se añade la muestra y se mide el descenso en la absorbancia, el cual es proporcional a la actividad de la misma frente al radical. Las medidas de absorbancia se transforman en actividad antioxidante utilizando el ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX) como referencia, por lo que la actividad antioxidante de un vino se da en forma de "capacidad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC)". Otro tipo de ensayos, que también emplean el TROLOX como referencia son el ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC), que mide la capacidad de los antioxidantes para proteger a una proteína del daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido⁵⁰, y el ensayo de la capacidad antioxidante total del plasma (FRAP), que mide la capacidad de los antioxidantes contenidos en una muestra para reducir el complejo tripiridiltriazina férrico⁵¹.

Además de estos, se ha propuesto el uso de ácidos fenólicos como agentes reductores que catalizan el crecimiento de nanopartículas de oro. Las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro formadas en presencia de estos compuestos se relacionan con la actividad antioxidante de la muestra⁵².

Este tipo de ensayos se emplean habitualmente para evaluar la capacidad antioxidante de diferentes muestras y poder realizar una comparación entre ellas. Sin embargo los polifenoles no son las únicas sustancias presentes en las muestras capaces de dar una respuesta positiva en estos ensayos por lo que estos índices, aunque presentan correlación con el contenido de polifenoles, no son indicadores absolutos de estos compuestos.

I.3.2. Compuestos fenólicos totales

Para la medida de compuestos fenólicos totales se emplea habitualmente la espectrofotometría, siendo el método Folin-Ciocalteu (FC) el más comúnmente utilizado. Está basado en la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 740 nm del complejo de fosfomolibdato y fosfotungstato reducido por agentes reductores. Estos agentes reductores se corresponden con los polifenoles cuando se analizan muestras ricas en ellos, como el caso del vino. Sin embargo este método no es específico ya que pueden existir otras sustancias diferentes con suficiente poder reductor en la muestra⁵³, siendo frecuente la sobreestimación del contenido de polifenoles. Los resultados obtenidos mediante este método se expresan generalmente como cantidad equivalente de ácido gálico.

Otro método empleado de forma particular para el análisis en vinos es la medida directa de la absorbancia a 280 nm, la cual es proporcional a la cantidad de polifenoles totales de la muestra. Esta medida es útil en este caso por ser la longitud de onda de absorción de los anillos bencénicos presentes en la estructura de los polifenoles y no hay interferencias importantes de otros compuestos presentes en la matriz. Generalmente el contenido de polifenoles no se expresa en este caso como una concentración sino como un índice general adimensional por lo que es utilizado casi exclusivamente en el ámbito enológico como parámetro comparativo entre muestras.

Como alternativa a los métodos espectrofotométricos descritos, desde hace unos años se ha comenzado a utilizar técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica (CV) y la voltamperometría diferencial de pulsos (DPV). Este tipo de métodos son cada vez más usados debido a la relevancia en la información que aportan, su sencillez y su capacidad para analizar muestras coloreadas o turbias. Son consideradas el equivalente electroquímico del ensayo espectrofotométrico y las señales voltamperométricas anódicas obtenidas en intervalos de potencial característicos están relacionadas con la oxidación electroquímica de diferentes clases de compuestos fenólicos. Así, la presencia de señales voltamperométricas a potenciales bajos está relacionada con la presencia en la muestra de compuestos fenólicos de elevada actividad antioxidante, mientras la baja actividad antioxidante se refleja en una actividad electroquímica a potenciales mayores. La intensidad de corriente o la carga medida a un potencial específico se emplean para estimar la capacidad antioxidante y/o la cuantificación de los polifenoles totales. En la tabla 4 se muestran algunos trabajos de investigación realizados empleando este tipo de técnicas para determinar el índice de polifenoles totales o la capacidad antioxidante de un vino, en la cual se indican el tipo de muestra, los compuestos fenólicos analizados, la técnica con el tipo de electrodo de trabajo empleado, la realización de ensayos de capacidad antioxidante e índice de polifenoles totales mediante métodos espectrofotométricos a modo comparativo y algunas observaciones.

Además se han desarrollado biosensores electroquímicos para la determinación de compuestos fenólicos en vinos. Los biosensores presentan determinadas ventajas entre las que se encuentran la mínima preparación de muestra, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad, tiempo de respuesta rápido y posibilidad de analizar la muestra *in situ*. Estos dispositivos se basan en la actividad de las enzimas polifenoloxidasas o peroxidasas, las cuales se fijan a un transductor electroquímico. El mecanismo de actuación de las polifenoloxidasas es la catálisis de la oxidación selectiva de compuestos fenólicos a su correspondiente quinona con la reducción de oxígeno a agua. Por su parte las peroxidasas catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno a agua, donde los polifenoles actúan como donadores de electrones. En ambos casos, la quinona producida en la reacción enzimática puede ser detectada electroquímicamente a potenciales negativos moderados. En la tabla 5 se resumen las publicaciones científicas en las que se han empleado diferentes biosensores electroquímicos, en la que se indica la enzima empleada en cada caso, el tipo de inmovilización, el transductor, la muestra empleada, el intervalo de respuesta lineal, la realización o no del ensayo de polifenoles totales de referencia, la estabilidad del biosensor y la referencia bibliográfica del trabajo.

Tabla 4. Resumen de publicaciones científicas de índice de polifenoles totales empleando técnicas electroquímicas

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnica electroquímica	Ensayo de capacidad antioxidante	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto y suero sanguíneo	Ácido ascórbico, flavonoides, ácidos fenólicos y <i>l</i> -resveratrol	CV (GCE)	Kit RANDOX (ABTS)	No determinado	Estimación de la fuerza reductora relativa de cada antioxidante	54
Vino tinto y blanco	Flavonoides y ácidos fenólicos	CV (GCE)	No determinada	Folin-Ciocalteu	Estimación de la fuerza reductora relativa de cada antioxidante. Análisis cualitativos de compuestos fenólicos en vinos	55
Vino tinto y blanco	-	CV (GCE)	Capacidad para retrasar la oxidación del linoleato de metilo	Folin-Ciocalteu	Evaluación directa de la capacidad antioxidante de muestras reales	29
Vino tinto y blanco	Flavonoides y ácidos fenólicos	CV (GCE)	No determinada	Folin-Ciocalteu	Mejor correlación para vino blanco que para vino tinto	56

Tabla 4. Resumen de publicaciones científicas de índice de polifenoles totales empleando técnicas electroquímicas

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnica electroquímica	Ensayo de capacidad antioxidante	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto	-	CV (GCE)	Capacidad para retrasar la oxidación del linoleato de metilo	Folin-Ciocalteu	Baja correlación entre la capacidad antioxidante y la edad del vino	57
Vino tinto y blanco	(+)-Catequina	CV (GCE)	No determinada	Folin-Ciocalteu	Baja correlación	58
Vino tinto y blanco	Ácido ascórbico, glutatión, sulfuros y polifenoles	CV (GCE)	No determinada	Absorbancia a 280 nm	Interferencia de SO ₂ suprimida con acetaldehído. Medida independiente de polifenoles totales y fracción de fenoles tipo catecol. Mejor correlación para blancos que para tintos	59, 30
Vino tinto y blanco	-	CV (electrodo de grafito pirrolítico)	No determinada	No determinada	Concepto de "espectro redox de vinos"	60

Tabla 4. Resumen de publicaciones científicas de índice de polifenoles totales empleando técnicas electroquímicas

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnica electroquímica	Ensayo de capacidad antioxidante	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto y blanco	-	CV (SPE)	No determinado	No determinado	Concepto de "distribución espectral" de compuestos fenólicos basada en respuestas voltamperométricas	61
Vino tinto y blanco	-	CV (GCE)	No determinado	Folin-Ciocalteu	Buena correlación entre concentración de ácido ascórbico y SO ₂ y el FC. Estudio de la degradación oxidativa de vinos por CV	62, 63
Vino tinto	Ácido gálico y (+)-catequina como estándares	DPV (GCE)	ABTS y DPPH	Folin-Ciocalteu	Los polifenoles individuales fueron determinados mediante HPLC. Elevadas correlaciones entre polifenoles totales medidos por DPV, FC y HPLC	5
Vino tinto	Ácido gálico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, y (-)-epigallocatequina	CV y DPV (grafito-PVC)	No determinado	No determinado		64

Tabla 4. Resumen de publicaciones científicas de índice de polifenoles totales empleando técnicas electroquímicas

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnica electroquímica	Ensayo de capacidad antioxidante	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino blanco	Ácido cafeico	CV (SPE modificado con Ir)	DPPH	Folin-Ciocalteu		65
Vino tinto y blanco	Malvidina-3-O-glucósido	DPV (GCE)	ABTS	Folin-Ciocalteu	Analizados los extractos de vino y las antocianinas fueron caracterizadas por HPLC. No hay estudios de correlación	66
Vino tinto	(-)-epicatequina y (-)-epigallocatequina	CV (GCE)	No determinado	No determinado	Correlaciones entre astringencia y respuesta de CV de flavanoles y malvidina	67
Vino tinto y blanco	Ácido gálico	DPV (pasta de nanotubos de carbono y grafito)	No determinado	Folin-Ciocalteu	Buena correlación con FC	68

Tabla 4. Resumen de publicaciones científicas de índice de polifenoles totales empleando técnicas electroquímicas

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnica electroquímica	Ensayo de capacidad antioxidante	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto	Catequina, quercetina, t-resveratrol y ácido elágico	CV (DME)	DPPH	Folin-Ciocalteu	Determinación indirecta de la capacidad antioxidante a través de la señal de oxidación polarográfica de peróxido de hidrógeno. Buena correlación con los ensayos espectrofotométricos	69
Vino tinto	-	Culombimetría (Pt)	Kit RANDOX (ABTS)	Folin-Ciocalteu	Ensayos de culombimetría y capacidad antioxidante de ABTS a corriente constante de 2 mA. Empleo de Trolox como referencia. Estimación de la equivalencia de polifenoles y Trolox	70, 20

Tabla 4. Resumen de publicaciones científicas de índice de polifenoles totales empleando técnicas electroquímicas

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnica electroquímica	Ensayo de capacidad antioxidante	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto y otras bebidas	Compuestos fenólicos y no fenólicos solubles en agua	CV (GCE)	DPPH	No determinado	Independencia de turbidez y amperometría frente a espectrofotometría. Detección indirecta por decaimiento de la señal de DPPH usando Trolox como referencia. Estimación de la equivalencia de polifenoles y Trolox	71

Tabla 5. Resumen de publicaciones científicas de índice de polifenoles totales empleando biosensores electroquímicos

Enzima	Inmovilización	Diseño experimental y transductor	Muestra	Intervalo de respuesta lineal / μM	Polifenoles totales (PT)	Estabilidad	Referencia
Tirosinasa	Adsorción física	Batch (CPE-Ru)	Vino	5,9-350 (equivalentes de ácido gálico)	No determinado	3-4 h	72
Lacasa	Adsorción física en membranas de polietersulfona	Batch (Pt)	Vino	2,0-14,0 (equivalentes de (+)-catequina y ácido cafeico)	Folin-Ciocalteu	-	73
Lacasa	Adsorción física en membranas de polietersulfona	Batch (Pt)	Vino tinto, blanco y rosado	5-35 (equivalentes de ácido gálico)	Folin-Ciocalteu y ABTS	-	74
Tirosinasa	Entrecruzamiento con glutaraldehído	Batch (GCE-AuNP)	Vino	25-900 (equivalentes de ácido gálico)	Folin-Ciocalteu	<18 días	75
Lacasa	Adsorción física	Batch y FIA (GCE)	Vino tinto, blanco y rosado	0,02-4,7 (equivalentes de ácido gálico)	Folin-Ciocalteu	4 días	76

Tabla 5. Resumen de publicaciones científicas de índice de polifenoles totales empleando biosensores electroquímicos

Enzima	Inmovilización	Diseño experimental y transductor	Muestra	Intervalo de respuesta lineal / μM	Polifenoles totales (PT)	Estabilidad	Referencia
PPO	Atrapamiento en electrodo de pasta de carbono	Batch (CPE de microesferas de glassy carbon)	Vino y té	Más de 70 (equivalentes de fenol)	No determinado	4 meses	77
Lacasa	Atrapamiento químico y físico con prepolímero de poliacetidina	FIA (electrodos serigráficos de nanotubos de carbono)	Vino	0,6-100 (equivalentes de ácido gálico)	Folin-Ciocalteu	10 días	78
Tirosinasa	Gel κ -carragenato	Batch (Pt acoplado con transductor para oxígeno)	Vino tinto y blanco	No escrito	Folin-Ciocalteu	-	79
Lacasa-tirosinasa	Entrecruzamiento en matriz de sol-gel diglicerilsilano	FIA (grafito SPE modificado con ferroceno)	Vino y mosto	No escrito	Folin-Ciocalteu	5 días	80
Tirosinasa	Matriz entrecruzada de glutaraldehído con albúmina de suero bovino	Batch y FIA (SPE-ferroceno)	Vino	10,6-266,0 (equivalentes de ácido gálico)	No determinado	30 días	81

Tabla 5. Resumen de publicaciones científicas de índice de polifenoles totales empleando biosensores electroquímicos

Enzima	Inmovilización	Diseño experimental y transductor	Muestra	Intervalo de respuesta lineal / μM	Polifenoles totales (PT)	Estabilidad	Referencia
Peroxidasa	Monocapas autoensambladas de tioles	Batch (Au)	Vino y té	<25 (equivalentes de (+)-Catequina)	No determinado	-	82
Peroxidasa	Adsorción física, atrapamiento en compuesto	Bath (CPE-ferroceno)	Vino y té	<15 (equivalentes de (+)-Catequina)	No determinado	15 días	83
Peroxidasa	Atrapamiento en compuesto	Batch (Compósitos de nanotubos de carbono)	Vino y té	0,2-228 (equivalentes de <i>t</i> -resveratrol)	Folin-Ciocalteu	5 días	84

I.3.3. Separación y detección de compuestos fenólicos

Para la separación y detección individual de los polifenoles se emplean diferentes técnicas y sistemas de detección, principalmente la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y la electroforesis capilar (CE) con detectores UV-Visible, fluorimétricos, espectrómetro de masas y electroquímicos. También se han empleado la detección electroquímica o UV acopladas a un sistema de inyección en flujo (FIA) o la cromatografía de gases (GC). Esta última requiere una derivatización previa de la muestra si se quiere separar los polifenoles no volátiles⁸⁵. En la tabla 6 se muestra un resumen de publicaciones científicas en las que se emplean este tipo de técnicas, en la cual se indica la muestra utilizada, los polifenoles analizados, el tipo de técnica y detección empleadas, el electrodo utilizado en el caso de la detección electroquímica, la fase móvil o electrolito portador empleados, la realización o no de ensayo de polifenoles totales a modo comparativo y algunas observaciones.

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino y uvas	Resveratrol (<i>trans</i> y <i>cis</i>), piceatannol, (+)-catequina y (-)-epicatequina	GC-MS	-	Helio	No determinado	Separación mediante cromatografía de gases con previa extracción en fase sólida y derivatización del extracto con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)	86
Vino tinto	23 compuestos fenólicos	GC-MS	-	Helio	No determinado	Separación mediante cromatografía de gases con previa dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y posterior derivatización con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)	87

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto	22 compuestos fenólicos	GC-MS	-	Helio	No determinado	Separación mediante cromatografía de gases con previa extracción líquido-líquido con acetato de etilo y posterior derivatización del extracto con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)	88
Vino tino	Polifenoles y antocianinas	HPLC-UV (280 y 520 nm)	-	Acetonitrilo (polifenoles y antocianinas) Metanol/ agua (análisis de ϵ -resveratrol)	No determinado	Uso de técnicas quimiométricas para el estudio del contenido polifenólico en diferentes variedades de uva y diferentes años del vino	89

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto y blanco	15 compuestos fenólicos	HPLC-DAD (280, 325 y 360 nm)	-	Metanol/ácido fosfórico	No determinado	Diferencia en polifenoles totales entre vinos tintos y blancos. Diferencias en composición fenólica entre vinos tintos y blancos y entre uvas de diferentes zonas geográficas. Compuestos fenólicos mayoritarios y minoritarios en vinos	90
Vino tinto y blanco	Compuestos fenólicos monoméricos	HPLC-DAD (200-450 nm)	-	Metanol/agua	No determinado	Optimización del método de separación con columna monolítica en fase reversa, análisis de muestras reales, diferencias en composición fenólica en vinos en función de técnicas analíticas, origen del vino y variedad de uva	91

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto, uva y orujo	Resveratrol cis y trans, quercetina	HPLC-DAD (306 y 370 nm) HPLC-ESI-MS	-	Ácido fórmico/ acetonitrilo/ propanol	No determinado	Optimización del método de separación de los compuestos, cuantificación de <i>trans</i> -resveratrol y quercetina en el orujo (producto obtenido en el paso de prensado de uva) y piel de uva	92
Vino blanco	Flavonoles, procianidinas y <i>trans</i> -resveratrol	HPLC-UV-Fluorescencia (absorción UV: 280, 320, 360 nm, Emisión de Fluorescencia 360, 278, 392 y 300 nm)	-	Agua/ acetonitrilo/ ácido acético	No determinado	Optimización del método de separación. Estudio de la capacidad antioxidante (DPPH) y correlación con compuestos fenólicos. Buenas correlaciones entre algunos compuestos fenólicos y capacidad antioxidante	27

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto	ε-Resveratrol	HPLC-Quimioluminiscencia (306 nm)	-	Metanol/agua	No determinado	ε-Resveratrol mejora la quimioluminiscencia del sistema luminol-ferrocianuro. Buena correlación con HPLC-DAD	93
Vino tinto	Compuestos fenólicos de bajo peso molecular	HPLC-DAD-ESI-MS (520 y 510 nm)	-	Agua/acetronitrilo/Ácido fórmico	No determinado	Identificación de compuestos (también minoritarios). Estudios de capacidad antioxidante (DPPH) y relación con compuestos fenólicos	94
Vino blanco, zumo de uva y té verde	Ácidos fenólicos	UPLC-MS/MS	-	Acetonitrilo/agua/ácido acético	No determinado	Optimización de un método de separación e identificación de ácidos fenólicos en bebidas	95

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto y blanco	25 antioxidantes naturales	HPLC-culombimetría (0,6 a 0,9 V)	GCE	Acetonitrilo/tampón de acetato amónico (3,00 < pH < 3,41)	No determinado	Dilución de las muestras de vino. Relación de señales obtenidas con un detector CoulArray, de ocho celdas conectadas en serie. Los diferentes potenciales de trabajo se emplean para la identificación de polifenoles	96
Vino tinto y blanco	4-etilcatecol, 4-etilfenol, 4-etilguayacol, 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol	HPLC-culombimetría (0,1 a 0,8 V)	Electrodos de grafito poroso	Tampón fosfato 50 mM pH 3,40/ acetonitrilo/ metanol	No determinado	Análisis directo de las muestras de vino. La relación de señales a diferente potencial se empleó para la identificación de picos desconocidos. Buena correlación con resultados de cromatografía de gases	97, 98

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto	Quercetina, miricetina, (+)-catequina y (-)-epicatequina	HPLC-culombimetría (0,1 a 0,8 V)	Electrodos de grafito poroso	Ácido fosfórico/ acetonitrilo	No determinado	Detección simultánea con DAD. Tratamiento con HCl y Metanol de las muestras de vino	99
Vino tinto y blanco	21 polifenoles	HPLC- amperometría (0,4 y 0,8 V)	GCE	Metanol/ ácido tartárico en agua	Folin-Ciocalteu y ensayo de flavonoides totales	DAD simultáneo. Estudios de correlación entre resultados cromatográficos y espectrofotométricos y determinación electroquímica de polifenoles totales	100
Vino tinto y blanco	7 ácidos fenólicos	HPLC- amperometría (0,65 V)	GCE	Metanol/ ácido fosfórico	No determinado	Contenido de ácidos fenólicos relacionado con la variedad de uva y el envejecimiento del vino	101

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto	Ácido cafeico y <i>p</i> -cumárico	HPLC- amperometría (1,0 V)	Oro	Metanol/ tampon fosfato	No determinado	Dilución de la muestra de vino en metanol. Amplio intervalo lineal y buena estabilidad de señal.	102
Vino tinto y blanco	<i>Trans</i> - y <i>cis</i> - resveratrol	HPLC- amperometría (0,75 V)	GCE	Ácido fosfórico y cloruro sódico en acetonitrilo/ agua	No determinado	Análisis directo de muestras de vino. Detección UV simultánea. Estudio de la distribución de los dos isómeros	15
Vino	<i>t</i> -Resveratrol, <i>c</i> -resveratrol, ácidos fenólicos, flavonoides	FIA-CE-DAD (280 nm)	-	Disolución tampon borato sódico 0,1 M, pH 9,5	No determinado	Separación por electroforesis capilar y previa inyección en flujo con extracción en fase sólida en columnas C-18	103

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino	Compuestos fenólicos	CE-DAD (206, 217 y 312 nm)	-	Disolución fosfato 25 mM y borato 10 mM pH 8,8	Folin-Ciocalteu	Determinación de capacidad antioxidante de un vino (Método ABTS) y su relación con el contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu). Identificación de los polifenoles y determinación de perfil polifenólico de un vino mediante electroforesis capilar en zona	104
Vino	(-)-Epicatequina, (+)-catequina, <i>l</i> -resveratrol, ácidos cafeico, p-cumárico, sórbico, gentísico, ascórbico, láctico, gálico	CZE-UV (306, 260 y 190 nm)	-	Tetraborato sódico (3,0<pH<3,9)	No determinado	Análisis directo de vinos tintos y blancos y comparación de sus perfiles polifenólicos. Empleo de electroferograma a 190 nm como huella dactilar del vino	105

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino	16 compuestos fenólicos	CZE-UV (217 nm)	-	Tampón borato pH 9,0	No determinado	Desarrollo de un método de separación con preconcentración en columna	106
Vino tinto	Compuestos fenólicos no coloreados	CZE-UV (280 nm)	-	Tampón borato pH 9,5	No determinado	Comparación de separación de compuestos fenólicos no coloreados de un vino tinto mediante CZE y HPLC	107
Vino tinto	Flavonoides y ácidos fenólicos	ITP-CZE con detector conductimétrico y espectrofotométrico (254 nm)	-	Dos disoluciones tampón para cada parte de la separación	No determinado	Desarrollo de un método de separación por CZE con una etapa previa de separación mediante isotacoforesis (ITP)	108

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino	±-Resveratrol, (-)-epicatequina, (+)-catequina	CE- amperometría (0,85 V)	Electrodo de disco de carbono	Tampón borato pH 9,2	No determinado	Dilución de las muestras de vino en tampón de separación. Estudios de recuperación	109, 110
Vino tino	±-Resveratrol, (-)-epicatequina, (+)-catequina, quercetina y ácido gálico	CE- amperometría dual (1,0 y 0,8 V)	Microelectrodos opuestos duales de fibra de carbono	Tetraborato, β- ciclodextrina y metanol pH 9,0	No determinado	Se empleó la relación de corriente 1,0/0,8 V para confirmar la identidad del pico y pureza	111
Vino blanco	(+)-Catequina y ácidos clorogénico, ferúlico, gálico y cafeico	CE- amperometría (0,2 V)	GCE modificado con una capa de nanotubos de carbono	Tampón borato pH 9,2	No determinado	Análisis directo de muestras de vino. Estabilidad elevada con potencial de detección bajo	112

Tabla 6. Resumen de publicaciones científicas de separación y detección de polifenoles

Muestra	Compuestos fenólicos	Técnicas de flujo y sistema de detección	Electrodo	Fase móvil o electrolito portador	Polifenoles totales (PT)	Observaciones	Referencia
Vino tinto	Ácidos clorogénico y vanílico	Microchip CE-amperometría (1,0 V)	SPE	Tampón borato pH 9,5 con metanol	No determinado	Dilución de las muestras de vino en tampón de separación	113
Vino tino		CE-detección Microchip CE-amperometría (1,0 V)	SPE	Tampón borato pH 9,5 con metanol	No determinado	Análisis directo de las muestras. Empleo de los perfiles electroforéticos para la identificación de vinos	114

I.4. BIBLIOGRAFÍA

1. H. Kim, M. J. Quon, J. Kim, "New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the Green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate", *Redox Biology*, 2, 187-195, 2014.
2. E. Hurtado-Fernández, M. Gómez-Romero, A. Carrasco-Pancorbo, A. Fernández-Gutiérrez, "Application and potential capillary electrophoresis methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 1130-1160, 2010.
3. I. Lesscheave, A. C. Noble, "Polyphenols: Factor influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences", *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 330-335, 2005.
4. S. C. Renaud, R. Guéguen, J. Schenker, A. d'Houtaud, "Alcohol and mortality in middle-aged men from Eastern France", *Epidemiology*, 9, 184-188, 1998.
5. M. Šeruga, I. Novak, L. Jakobek, "Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods", *Food Chemistry*, 124, 1208-1216, 2011.
6. A. L. Waterhouse, "Wine phenolics", *New York Academy of Sciences*, 957, 21-36, 2002.
7. A. Scalbert, I. T. Johnson, M. Salmarsh, "Polyphenols: antioxidants and beyond", *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215-217, 2005.
8. P. M. Kris-Etherton, K. D. Hecker, A. Bonamone, S. M. Coval, A. E. Binkoski, K. F. Hilpert, A. E. Griend, T. D. Etherton, "Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer", *Excepta Medica*, 113, 71-88, 2002.
9. J. D. Lambert, R. J. Elyas, "The antioxidant and pro-oxidant activities of Green tea polyphenols: A role in cancer prevention", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, 65-72, 2010.
10. S. Petti, C. Scully, "Polyphenols oral health and disease: a review", *Journal of Dentistry*, 37, 413-423, 2009.
11. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, "Polyphenols: food sources and bioavailability", *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747, 2004.
12. L. Bravo, "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance", *Nutrition Review*, 56, 317-333, 1998.
13. R. G. Peres, G. A. Micke, M. F. M. Tavares, D. B. Rodríguez-Amaya, "Multivariate optimization, validation and application of capillary electrophoresis for simultaneous determination of polyphenols and phenolic acids in Brazilian wines", *Journal of Separation Science*, 32, 3822-3828, 2009.
14. O. Gürbüz, D. Goçmen, F. Dağdelen, M. Gürsey, S. Aydin, I. Şahin, L. Büyükuysal, M. Usta, "Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection", *Food Chemistry*, 100, 518-525, 2007.
15. I. Kolouchová-Hanlířková, K. Melzoch, V. Filip, J. Šmidrkal, "Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detection in wines", *Food Chemistry*, 82, 151-158, 2004.
16. M. A. Rodríguez-Delgado, G. González, J. P. Pérez Trujillo, F. J. García-Montelongo, "Trans-resveratrol in wines from Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography", *Food Chemistry*, 76, 371-375, 2002.

17. X. Vitrac, A. Bornet, R. Vanderline, J. Valls, T. Richard, J-C. Delaunay, J-M. Mérillon, P-L. Teissédre, "Determination of stilbenes (δ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5664-5669, 2005.
18. M. S. Fernández-Pachón, D. Villaño, A. M. Troncoso, M.C. García-Parrilla, "Determination of the phenolic compounds of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity", *Analytica Chimica Acta*, 563, 101-108, 2006.
19. A. Arnaus, D. P. Makris, P. Kefalas, "Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece", *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655-665, 2002.
20. Á. M. Alonso, D. A. Guillén, C. G. Barroso, B. Puertas, A. García, "Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5832-5836, 2002.
21. D. Villaño, M. S. Fernández-Pachón, A. M. Troncoso, M. C. García-Parrilla, "Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines", *Food Chemistry*, 95, 394-404, 2006.
22. K. Chira, N. Pacella, M. Jourde, P.-L. Teissédre, "Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age", *Food Chemistry*, 126, 1971-1977, 2011.
23. V. Cheynier, "Polyphenols in foods are more complex than often thought", *Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223-229, 2005.
24. F. Alén-Ruiz, M. S. García-Falcón, M. C. Pérez-Lamela, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gándara, "Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines", *Food Chemistry*, 113, 56-60, 2009.
25. R. S Jackson, "Wine Science. Principles and applications", 3rd Edition, Elsevier, Amsterdam, Holanda, Capítulo 6, 2008.
26. N. Paixão, V. Pereira, J. C. Marques, J. S. Câmara, "Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC", *Journal of Separation Science*, 31, 2189-2198, 2008.
27. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, M. Asunción Lage-Yusty, M. J López-Hernández, "HPLC analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay", *Food Research International*, 42, 1018-1022, 2009.
28. V. Pereira, J. S. Câmara, J. Cacho, J. C. Marques, "HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples", *Journal of Separation Science*, 33, 1204-1215, 2010.
29. P. A. Kilmartin, H. Zou, A. L. Waterhouse, "Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response", *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 294-302, 2002.
30. O. Makhotkina, P. Kilmartin, "The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide", *Analytica Chimica Acta*, 668, 155-165, 2010.
31. P. Fernández-Zurbano, V. Ferreira, A. Escudero, J. Cacho, "Role of hydrocinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4937-4944, 1998.
32. R. J. Robbins, "Phenolic Acids in foods: An overview of analytical methodology", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887, 2003.

33. Y. Koshihara, T. Neichi, S. I. Murota, A. N. Lao, Y. Fujimoto, T. Tasuno, "*Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis*", *Biochimica and Biophysica Acta*, 792, 92-97, 1984.
34. C. V. Rao, D. Desai, B. Simi, N. Kulharmi, S. Amin, B. S. Reddy, "*Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci, formation in rat colon*", *Cancer Research*, 53, 4182-4188, 1993.
35. M. R. Olthof, P. C. H. Hollman, M. Katan, "*Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans*", *Human Nutrition and Metabolism*, 131, 66-71, 2001.
36. M. Gerogiannaki-Christopoulou, P. Athanasopoulos, N. Kyriakidis, I. A. Gerogiannaki, M. Spanos, "*trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and White grape varieties*", *Food Control*, 17, 700-706, 2006.
37. S. Kostadinović, A. Wilkens, M. Stefova, V. Ivanova, B. Vojnoski, H. Mirhosseini, P. Winterhalter, "*Stilbene levels and antioxidant activity of Vranec and Merlot wines from Macedonia: Effect of variety and enological practices*", *Food Chemistry*, 135, 3003-3009, 2012.
38. M. I. Fernández-Mar, R. Mateos, M. C. García-Parrilla, B. Puertas, E. Cantos-Villar, "*Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review*", *Food Chemistry*, 130, 797-813, 2012.
39. M. E. Juan, I. Alfaro, J. M. Planas, "*Colorectal cancer chemoprevention by trans-resveratrol*", *Pharmacological Research*, 65, 584-591, 2012.
40. J. Kumar Kundu, Y.-J. Surh, "*Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives*", *Cancer Letters*, 269, 243-261, 2008.
41. C. Ramassamy, "*Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets*", *European Journal of Pharmacology*, 545, 41-64, 2006.
42. F. Jin, Q. Wu, Y.-F. Lu, Q.-H. Gong, J.-S. Shi, "*Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats*", *European Journal of Pharmacology*, 600, 78-82, 2008.
43. M. González-Castejón, A. Rodríguez-Casado, "*Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review*", *Pharmacological Research*, 64, 438-455, 2011.
44. F. Zamora Martín. "*Elaboración y crianza de vino tinto: aspectos científicos y prácticos*", AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa, 2003.
45. V. Cheynier, M. Dueñas-Paton, E. Salas, C. Maury, J.-M. Souquet, P. Sarni-Manchado, H. Fulcrand, "*Structure and properties of wine pigments and tannins*", *Phenolics Symposium, ASEV*, 298-305, 2005.
46. J. M. Álvarez, "*Tanino: la revolución enológica, mito o realidad*", *Revista Enología* Nº2, 1-15, 2007.
47. P. Iacopini, M. Baldi, P. Storch, L. Sebastiani, "*Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interaction*", *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 589-598, 2008.
48. J. L. Donovan, J. R. Bell, S. Kasim-Karakas, J. B. German, R. L. Walzem, R. J. Hansen, A. L. Waterhouse, "*Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine*", *Human Nutrition and Metabolism*, 1662-1668, 1999.
49. D. Zanchi, C. Poulain, P. Konarev, C. Tribet, I. Svergun, "*Colloidal stability of tannins: astringency, wine tasting and beyond*", *Journal of Physics: Condensed Matter*, 20, 1-6, 2008.

50. M. S. Fernández-Pachón, D. Villaño, M. C. García-Parrilla, A. M. Troncoso, "Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition", *Analytica Chimica Acta*, 513, 113-118, 2004.
51. M. Ozgen, R. N. Reese, A. Z. Tulio, J. C. Schieerens, A. R. Miller, "Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1151-1157, 2006.
52. M. Scampicchio, J. Wang, A. J. Blasco, A. Sánchez Arribas, S. Mannino, A. Escarpa, "Nanoparticle-based assays of antioxidant activity", *Analytical Chemistry*, 78, 2060-2063, 2006.
53. N. Paixão, R. Perestrelo, J. C. Marques, J. S. Câmara, "Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines", *Food Chemistry*, 105, 204-214, 2007.
54. P. A. Kilmartin, "Electrochemical detection of natural antioxidants: Principles and protocols", *Antioxidants & Redox Signaling*, 3, 941-955, 2001.
55. P. A. Kilmartin, H. Zou, A. L. Waterhouse, "A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1957-1965, 2001.
56. P. A. Kilmartin, H. Zou, A. L. Waterhouse, "Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response", *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 294-302, 2002.
57. V. Roginsky, D. de Beer, J. F. Harbertson, P. A. Kilmartin, T. Barsukova, Douglas O. Adams, "The antioxidant activity of Californian red wines does not correlate with wine age", *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 86, 834-840, 2006.
58. J. Piljac, S. Martínez, T. Stipcevic, Z. Petrovic, M. Metikos-Hukovic, "Cyclic voltammetry investigation of the phenolic content of Croatian wines", *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 417-422, 2004.
59. O. Makhotkina, P. A. Kilmartin, "Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 633, 165-174, 2009.
60. O. Ksenzhek, S. Petrova, M. Kolodyazhny, "Redox spectra of wines", *Electroanalysis*, 19, 389-392, 2007.
61. A. Dhroso, S. Laschi, G. Marrazza, M. Mascini "A fast electrochemical technique for characterization of phenolic content in wine", *Analytical Letters*, 43, 1190-1198, 2010.
62. A. Rodriguez, A. C. Silva Ferreira, P. Guedes de Pinho, F. Bento, D. Gerardo, "Resistance to oxidation of white wines assessed by voltammetric means", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10557-10562, 2007.
63. R. C. Martins, R. Oliveira, F. Bento, D. Gerardo, V. V. Lopes, P. Guedes de Pinho, C. M. Oliveira, A. C. Silva Ferreira, "Oxidation management of white wines using cyclic voltammetry and multivariate process monitoring", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 12092-12098, 2008.
64. A. Ahuatl, M. M. Dávila, M. P. Elizalde, J. Mattusch, R. Wennrich, "Electrochemical detection of polyphenolic compounds using carbon composite electrodes", *ECS Transactions*, 3, 69-80, 2006.
65. K. Photinon, Y. Chalermchart, C. Khanongnuch, S.-H. Wang, C.-C. Liu, "A thick-film sensor as a novel device for determination of polyphenols and their antioxidant capacity in White wine", *Sensors*, 10, 1670-1678, 2010.

66. M. J. Aguirre, Y. Y. Chen, M. Isaacs, B. Matsuhira, L. Mendoza, S. Torres, "Electrochemical behaviour and antioxidant capacity of anthocyanins from Chilean red wine, grape and raspberry", *Food Chemistry*, 121, 44-48, 2010.
67. S. C. Petrovic, "Correlation of perceived wine astringency to cyclic voltammetric response", *American Journal of Enology and Viticulture*, 60, 373-378, 2009.
68. L. P. Souza, F. Calegari, A. J. G. Zarbin, L. Humberto M. Márcio F. Bergamini, "Voltammetric determination of the antioxidant capacity in wine samples using a carbon nanotube modified electrode", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7620-7625, 2011.
69. S. Ž Gorjanović, M. M. Novaković, P. V. Vujosavljević, F. T. Pastor, V. V. Tešević, D. Ž. Sužnjević, "Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in determination of antioxidant activity of strong alcohol beverages", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8400-8406, 2010.
70. A. M. Alonso, D. A. Guillén, C. G. Barroso, "Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products", *European Food Research & Technology*, 216, 445-448, 2003.
71. S. Milardović, D. Ivekovic, B. S. Grabarić, "A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical", *Bioelectrochemistry*, 68, 175-180, 2006.
72. W. T. Jewell, S. E. Ebeler, "Tyrosinase biosensor for the measurement of wine polyphenolics", *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 219-222, 2001.
73. S. A. S. S. Gomes, J. M. F. Nogueira, M. J. F. Rebelo, "An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine", *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 1211-1216, 2004.
74. D. M. A. Gil, M. J. F. Rebelo, "Evaluating the antioxidant capacity of wines: a laccase-based biosensor approach", *European Food Research & Technology*, 231, 303-308, 2010.
75. V. Carralero Sanz, M. L. Mena, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, "Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes. Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines", *Analytica Chimica Acta*, 528, 1-8, 2005.
76. M. Gamella, S. Campuzano, J. Reviejo J. M. Pingarrón "Electrochemical estimation of the polyphenol index in wines using a Laccase biosensor", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7960-7967, 2006.
77. M. C. Rodríguez, G. A. Rivas, "Glassy carbon paste electrodes modified with polyphenol oxidase. Analytical applications", *Analytica Chimica Acta*, 459, 43-51, 2002.
78. M. Di Fusco, C. Tortolini, D. Deriu, F. Mazzei, "Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine", *Talanta*, 81, 235-240, 2010.
79. L. Campanella, A. Bonanni, E. Finotti, M. Tomassetti, "Biosensor for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods", *Biosensors and Bioelectronics* 19, 641-651, 2004.
80. M. R. Montereali, L. Della Seta, W. Vastarella, R. Pilloton, "A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine", *Journal of Molecular Catalysis B; Enzymatic*, 64, 189-194, 2010.
81. M. R. Motereali, W. Vastarella, R. Pilloton, "Tyrosinase biosensor based on modified screen printed electrodes: measurements of total phenol content", *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85, 9-11, 2005.

82. S. Imabayashi, Y.-T. Kong, M. Watanabe, "Amperometric biosensor for polyphenol based on horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes", *Electroanalysis*, 13, 408-412, 2001.
83. Y.-T. Kong, S. Imabayashi, K. Kano, T. Ikeda, T. Kakiuchi, "Peroxidase-based amperometric sensor for the determination of total phenols using two-stage peroxidase reactions", *American Journal of Enology*, 52, 381-385, 2001.
84. A. Marcelo Granero, H. Fernández, E. Agostini, M. A. Zón, "An amperometric biosensor based on peroxidases from *Brassica Napus* for the determination of the total polyphenolic content in wine and tea samples", *Talanta*, 83, 249-255, 2010.
85. C. Proestos, D. Sereli, M. Komaitis, "Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS", *Food Chemistry*, 95, 44-52, 2006.
86. P. Viñas, N. Campillo, N. Martínez-Castillo, M. Hernández-Córdoba, "Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1216, 1279-1284, 2009.
87. L. Minuti, R. Pellegrino, "Determination of phenolic compounds in wines by novel matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography/mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1185, 23-30, 2008.
88. L. Minuti, R. Pellegrino, I. Tesei, "Simple extraction method and gas chromatography-mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine", *Journal of Chromatography A*, 1114, 263-268, 2006.
89. M. S. Pour Nikfardjam, L. Márk, P. Avar, M. Figler, R. Ohmacht, "Polyphenols, anthocyanins and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region", *Food Chemistry*, 98, 453-462, 2006.
90. V. Rastija, G. Srećnik, M. Medić-Šarić, "Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins", *Food Chemistry*, 115, 54-60, 2009.
91. M. Castellari, E. Sartini, A. Fabiani, G. Arfelli, A. Amati, "Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column", *Journal of Chromatography A*, 973, 221-227, 2002.
92. M. Careri, C. Corradini, L. Elviri, I. Nicoletti, I. Zagnoni, "Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape and winemaking byproducts", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5226-5231, 2003.
93. J. Zhou, H. Cui, G. Wan, H. Xu, Y. Pang, C. Duan, "Direct analysis of trans resveratrol in red wine by high performance liquid chromatography with chemiluminiscent detection", *Food Chemistry*, 88, 613-620, 2004.
94. S. Lucy Nixdorf, I. Hermosín-Gutiérrez, "Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity", *Analytica Chimica Acta*, 659, 208-215, 2010.
95. J. Gruz, O. Novák, M. Strnad, "Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS", *Food Chemistry*, 111, 789-794, 2008.
96. P. Jandera, V. Škeřiková, L. Řehová, T. Hájek, L. Baldriánová, G. Škopová, V. Kellner, A. Horna, "RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector", *Journal of Separation Science*, 28, 1005-1022, 2005.
97. R. Larcher, G. Nicolini, Chr. Puecher, D. Bertoldi, S. Moser, G. Favaro, "Determination of volatile phenols in wine using high-performance liquid chromatography with a coulometric array detector", *Analytica Chimica Acta*, 582, 55-60, 2007.

98. R. Larcher, G. Nicolini, D. Bertoldi, T. Nardin, "Determination of 4-ethylcatechol in wine by high-performance liquid chromatography-coulometric electrochemical array detection", *Analytica Chimica Acta*, 609, 235-240, 2008.
99. P. Matilla, J. Astola, J. Kumpulainen, "Determination of flavonoids in plant material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array detections", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5834-5841, 2000.
100. O. V. Brenna, E. Pagliarini, "Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4841-4844, 2001.
101. H. Kalkan, E. Kilinc, M. Oezsoez, "Identification and quantification of some wine phenolic acids by high-performance liquid chromatography equipped with electrochemical detection", *Acta Pharmacy Turcica*, 45, 111-124, 2003.
102. I. G. Casella, C. Colonna, M. Contursi, "Electroanalytical determination of some phenolic acids by high-performance liquid chromatography at gold electrodes", *Electroanalysis*, 19, 1503-1508, 2007.
103. L. Arce, M. T. Tena, A. Ríos, M. Valcárcel, "Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow simple clean-up system followed by capillary electrophoresis separation", *Analytica Chimica Acta*, 359, 27-38, 1998.
104. R. C. Minussi, M. Rossi, L. Bologna, L. Cordi, D. Rotilio, G. M. Pastore, N. Durán, "Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines", *Food Chemistry*, 82, 409-416, 2003.
105. J. Pazourek, G. González, A. L. Revilla, J. Havel, "Separation of polyphenols in Canary Islands wine by capillary zone electrophoresis without preconcentration", *Journal of Chromatography A*, 874, 111-119, 2000.
106. C. Augusto Ballus, A. Dillenburg Meinhart, R. Grando de Oliveira, H. Teixeira Godoy, "Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America", *Food Research International*, 45, 136-144, 2012.
107. C. García-Viguera, P. Bridle, "Analysis of a non-coloured phenolic compounds in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis", *Food Chemistry*, 54, 349-352, 1995.
108. R. Hamoudová, M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polášek, "Assay of phenolic compounds in red wine by on-line combination of capillary isotachopheresis with capillary zone electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, 1032, 281-287, 2004.
109. L. Gao, Q. Chu, J. Ye, "Determination of trans-Resveratrol in wines, herbs, and health food by capillary electrophoresis with electrochemical detection", *Food Chemistry*, 78, 255-260, 2002.
110. Y. Peng, Q. Chu, F. Liu, J. Ye, "Determination of phenolic constituents of biological interest in red wine by capillary electrophoresis with electrochemical detection", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 153-156, 2004.
111. F. Du, Y. Sing Fung, "Development of CE-dual opposite carbon-fiber micro-disk electrode detection for peak purity assessment of polyphenols in red wine", *Electrophoresis*, 31, 2192-2199, 2010.
112. M. Moreno, A. Sánchez-Arribas, E. Bermejo, A. Zapardiel, M. Chicharro, "Analysis of polyphenols in White wine by CZE with amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes", *Electrophoresis*, 32, 877-883, 2011.

113. M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino, M. Prakash Chatrathi, "*Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of phenolic acids*", Journal of Chromatography A, 1049, 189-194, 2004.
114. M. Scampicchio, S. Mannino, J. Zima, J. Wang, "*Chemometrics on microchips: Towards the classification of wines*", Electroanalysis, 17, 1215-1221, 2005.

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II.1. OBJETIVOS

En la Tesis Doctoral que se presenta se han establecido una serie de objetivos los cuales se indican a continuación:

1. Desarrollo de un electrodo modificado con una película de nanotubos de carbono para la determinación de compuestos polifenólicos.

Estudio de diferentes polímeros en los cuales se añaden nanotubos de carbono (MWCNT) con el objetivo de obtener dispersiones acuosas homogéneas y estables en el tiempo. Realización de modificaciones de un electrodo de "glassy carbon" (GCE) con las dispersiones de MWCNT. Estudios de la respuesta electroquímica de los electrodos modificados en presencia de polifenoles utilizando voltamperometría cíclica.

2. Estudios en un sistema FIA con detección amperométrica.

Acoplamiento de una celda electroquímica tipo "wall-jet" a un sistema FIA utilizando como electrodo de trabajo un GCE modificado con una película de nanotubos de carbono: estudio de las variables que influyen en la respuesta electroquímica para la detección de polifenoles.

3. Aplicación del método FIA a la determinación de polifenoles en vinos tintos y blancos. Correlación de resultados con ensayos espectrofotométricos.

Evaluación de los parámetros analíticos del método FIA con detección amperométrica y aplicación a vinos tintos y blancos. Introducción de índices electroquímicos basados en la detección selectiva utilizando potenciales de trabajo diferentes y su relación con el contenido de distintos grupos de polifenoles. Realización de los ensayos espectrofotométricos para la determinación de polifenoles totales y estudio de correlación de los resultados con los obtenidos para los índices electroquímicos.

4. Estudio de la separación y detección de polifenoles mediante electroforesis capilar con detección electroquímica.

Estudio de la separación electroforética de polifenoles. Acoplamiento de una celda electroquímica con un GCE modificado con una película de MWCNT a un equipo de electroforesis capilar. Estudio de los parámetros de influencia en una separación y detección de este tipo.

5. Aplicación de la metodología de electroforesis capilar desarrollada en el análisis de polifenoles en vinos.

Aplicación del método de electroforesis capilar desarrollado a la separación y detección de polifenoles en muestras de vinos.

6. Estudios de clasificación de vinos.

Realización de estudios quimiométricos para la elaboración de modelos de clasificación de vinos en función del tipo de uva principal presente en su composición, basados en los índices electroquímicos o perfiles electroforéticos.

II.2. PLAN DE TRABAJO

El desarrollo de un electrodo modificado con nanotubos de carbono, y su acoplamiento a celdas electroquímicas para un sistema FIA y un equipo de electroforesis capilar, con el fin de realizar la determinación de polifenoles totales en el primer caso, y la detección tras la separación de los compuestos en el segundo, se llevará a cabo siguiendo el plan de trabajo que se expone a continuación.

1. DESARROLLO DEL ELECTRODO MODIFICADO: ESTUDIO DE DISPERSIONES DE NANOTUBOS DE CARBONO.

- Condiciones de la dispersión: elección del polímero para dispersar los nanotubos de carbono.
- Estudios de la respuesta electroquímica de los electrodos modificados en presencia de polifenoles:
 - Naturaleza del electrolito soporte.
 - Influencia del pH de trabajo.
 - Influencia de la concentración de la disolución reguladora de trabajo.
 - Influencia de la fuerza iónica: presencia de sales inertes.

2. ESTUDIOS EN UN SISTEMA FIA CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA.

- Elección del flujo de trabajo.
- Evaluación de los potenciales de trabajo: voltamperogramas hidrodinámicos.
- Estudios de estabilidad del electrodo.

3. APLICACIÓN DEL MÉTODO FIA Y CORRELACIÓN CON ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.

- Evaluación de los parámetros analíticos del método.
- Aplicación a la determinación de polifenoles en muestras de vinos: obtención de índices electroquímicos.
- Realización de los ensayos espectrofotométricos para polifenoles totales.
- Evaluación de la correlación de los índices electroquímicos con los resultados de los ensayos espectrofotométricos, mediante:
 - Gráficos de correlación
 - Matrices de correlación

4. ESTUDIO DE LA SEPARACIÓN DE POLIFENOLES MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA Y SU APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES EN VINOS.

- Condiciones de la separación electroforética:
 - Influencia de la naturaleza y pH del tampón de separación.
 - Influencia de la concentración del tampón de separación.
 - Influencia del tiempo de introducción de muestra en el sistema.
 - Influencia de la presencia de disolventes orgánicos en el tampón de separación.
 - Influencia del voltaje aplicado de separación.
- Potencial de detección electroquímica: voltamperogramas hidrodinámicos.
- Evaluación de los parámetros analíticos del método desarrollado.
- Adaptación al análisis de polifenoles en muestras de vinos.

5. ESTUDIOS DE CLASIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VINOS A PARTIR DE LOS ÍNDICES ELECTROQUÍMICOS Y DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO.

- Aplicación de técnicas quimiométricas para la clasificación de vinos de dos variedades de uva diferentes:
 - Autoescalado de la matriz de datos
 - Evaluación de posibles agrupaciones mediante el uso de técnicas de clasificación no supervisada: análisis de clúster.
 - Estudio de las variables influyentes en la clasificación con el uso del análisis de componentes principales (PCA).
 - Realización de modelos de clasificación: análisis lineal discriminante (LDA).

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. APARATOS Y MATERIAL

III.1.1. Aparatos

- Analizador electroquímico μ AUTOLAB tipo III acoplado a un ordenador Pentium IV con software GEPES 4.9.007.
- Sistema de inyección en flujo formado por bomba peristáltica modelo ISM 834 (ISMATEC, Alemania), conectada a válvula de cuatro vías (Rheodyne tipo 5020, Alltech, España) con bucle de muestra de 100 μ L. Para la conexión se han empleado tubos de PTFE de 0,8 mm de diámetro interno y 1,6 mm de diámetro externo.
- Celda de flujo tipo "wall-jet" modelo EA-1096 Metrohm (Herisau, Suiza), con electrodo auxiliar de oro y electrodo de Ag/AgCl/KCl 3 M (Metrohm) como electrodo de referencia.
- Equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ Beckman Coulter (Madrid, España) acoplado a un ordenador Pentium IV con software 32 Karat 7.0.
- Celda electroquímica acoplable a equipos comerciales de electroforesis capilar (descrita en Electrophoresis, 30, 3480-3488, 2009). Fabricada en metacrilato, incluye un electrodo de pseudo-referencia de Ag y un electrodo auxiliar de Pt.
- Detector amperométrico Epsilon BAS (West Lafayette, IN, USA), conectado a ordenador Pentium IV con el software ChromGraph 2.34.00 (BAS) para la adquisición de datos.
- pH-metro Metrohm modelo 645 provisto de un electrodo combinado de vidrio y electrodo de Ag/AgCl/KCl 3 M.
- Sonda de ultrasonidos Sonics Vibra Cell, modelo VCX130, Sonics & Materials Inc, (Newtown, CT, USA). La frecuencia de vibración es de 20 KHz y la máxima potencia aplicada es de 130 W.
- Espectrofotómetro UV-Vis, Jasco modelo V-630 (Madrid, España).
- Balanza analítica KERN (Balingen, Alemania)
- Baño de ultrasonidos P Selecta (Barcelona, España).
- Equipo de agua ultrapura ($\rho > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) de Elga Purelab Option Q, Elga LabWater (High Wycombe, UK).
- Microscopio Dino-Lite Pro HR, AM7000/AD7000 series, Dino-Lite Europe, (Naarden, Holanda)
- Software XLStat 2008 (Addinsoft, París, Francia) para el análisis de datos multivariantes.

III.1.2. Electroodos

- Electroodos de "glassy carbon" de 3 mm de diámetro modelo CHI104 (CH Instruments; Austin, TX, USA).
- Electrodo de "glassy carbon" de 1 mm de diámetro (ALS; Tokio, Japón).
- Electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 1 M CHI111, (CH Instruments; Austin, TX, USA).
- Electrodo auxiliar de platino de 1 mm de diámetro (Goodfellow; UK).

III.1.3. Material para la modificación de electrodos

- Nanotubos de carbono multipared (MWCNT) de 30 ± 15 nm de diámetro, 5-20 μm de longitud, pureza > 95%, tipo "hollow", preparados por deposición química de vapor, con residuos del 1% de Fe y 0,1% de S, lote nº PD30L520-60805 (NanoLab; MA, USA).
- Polietilenimina (PEI) nº de catálogo P3143 (Sigma; Madrid, España).
- Polihistidina (PHys) nº de catálogo P9386 (Sigma; Madrid, España).
- Polilisina (PLys) nº de catálogo P2636 (Sigma; Madrid, España).

III.1.4. Material para el pulido de electrodos

- Alúmina de 0,3 y 0,05 μm de diámetro de partícula (Buehler; Lake Bluff, IL, USA).
- Alfombra de pulido nº 407212 (Buehler; Lake Bluff, IL, USA).

III.1.5. Columna capilar

- Columna de sílice recubierta de poliimida de 55 cm de longitud, 25 μm de diámetro interno y 365 μm de externo (Teknokroma; Barcelona, España).

III.1.6. Tratamiento de muestras

- Filtros de PTFE de 0,2 μm y 0,45 μm de diámetro de poro (Advantec MFS Inc; Pleasanton, CA, USA).

III.2. REACTIVOS, MUESTRAS, PREPARACIÓN DISOLUCIONES Y MUESTRAS

III.2.1. Reactivos

- Ácido acético, Scharlau (Sentmenat, España).
- Ácido bórico, Reactivos Carlo Elba (Ródano, Italia).
- Ácido clorhídrico, Panreac (Barcelona, España).
- Ácido etilendiaminotetraacético (AEDT), Panreac (Barcelona, España).
- Ácido sulfúrico, Panreac (Barcelona, España).
- Ácido tartárico, Panreac (Barcelona, España).
- Carbonato sódico, Panreac (Barcelona, España).
- (+)-Catequina, *trans*-resveratrol, quercetina y los ácidos fenólicos cafeico, sinápico, ferúlico, *p*-cumárico y gálico, Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- Cloruro de potasio, Panreac (Barcelona, España).

- Cloruro sódico, Panreac (Barcelona, España).
- D-fructosa, Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- D-glucosa, Merck (Darmstadt, Alemania).
- Disolución de Iodo $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (0,10 N), Scharlau (Sentmenat, España).
- Etanol, Scharlau (Sentmenat, España).
- Fosfato disódico, Merck (Darmstadt, Alemania).
- Hidróxido potásico, Merck (Darmstadt, Alemania).
- Hidróxido sódico, Reactivos Carlo Elba (Ródano, Italia).
- Metanol de grado HPLC, Scharlau (Sentmenat, España).
- Nitrato sódico, Reactivos Carlo Elba (Ródano, Italia).
- Nitrito sódico, Panreac (Barcelona, España).
- Potasio Hidrógeno Ftalato, Panreac (Barcelona, España).
- Reactivo DMACA, Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- Reactivo Folin-Ciocalteu, Sigma-Aldrich (Suiza).
- Solución de almidón al 1%, Scharlau (Sentmenat, España).
- Sulfato amónico, Panreac (Barcelona, España).
- Sulfato de manganeso, Panreac (Barcelona, España).
- Sulfato de magnesio, Panreac (Barcelona, España).
- Tricloruro de aluminio, Sigma-Aldrich (Madrid, España).

III.2.2. Muestras de vino

Para el primer estudio de vinos mediante FIA con detección electroquímica se han empleado las muestras de vino tinto y blanco que se muestran en la tabla 7 y que son de diferentes denominaciones de origen y variedades de uva, todos de la cosecha de los años 2007 y 2008 comprados en diferentes supermercados de la Comunidad de Madrid.

Para el estudio electroquímico del vino y su correlación con los ensayos espectrofotométricos se han empleado una serie de vinos blancos, mostrados en la tabla 8, de diferentes denominaciones de origen y varios tipos de uva. Todos los vinos empleados son de la cosecha del año 2010 y han sido adquiridos en diferentes supermercados de la Comunidad de Madrid.

Para los dos estudios de clasificación de los vinos en función del tipo de uva, utilizando como variables de clasificación los índices electroquímicos obtenidos a diferentes potenciales de trabajo y las señales más características del perfil electroforético de un vino, se han analizado 36 botellas de vino blanco de dos variedades de uva (Airén y Verdejo). Todos son de las cosechas de los años 2011 y 2012 y se han comprado en diferentes supermercados de la Comunidad de Madrid. En la tabla 9 se muestran los datos de las distintas botellas analizadas.

Tabla 7. Muestras de vinos analizadas en un sistema FIA y detección electroquímica

Vino tinto	D. O./ Procedencia	Tipo de Uva
Izadi	La Rioja	Tempranillo
Heredad de Torresano	Vinos de Madrid	Tempranillo
Alcorta	La Rioja	Tempranillo
Pueblo Viejo	La Rioja	Tempranillo
Vino blanco	D. O./ Procedencia	Tipo de Uva
Marqués de Riscal	Rueda	Verdejo
Martín Códax	Rías Baixas	Albariño
Alectum	Rías Baixas	Albariño
Viñas del Vero	Somontano	Gewürztraminer
Viña Esmeralda	Catalunya	Moscatel Alejandría- Gewürztraminer (85:15)

Tabla 8. Muestras de vinos empleadas para el estudio electroquímico

Vino	D. O./ Procedencia	Tipo de Uva
Don Simón	García Carrión. Murcia	Mezcla desconocida
Elegido	Viña Montebro. La Rioja	Mezcla desconocida
Blanco Carrefour. Tierra Extremadura	Tierra de Extremadura	Mezcla desconocida
Blanco Carrefour	Desconocida	Mezcla desconocida
Blanco Carrefour (marca blanca)	Desconocida	Mezcla desconocida
Don Simón Premium	García Carrión. Ciudad Real	Chardonnay
Peñasol	Félix Solís. Ciudad Real	Airén
Cerro de los pastores (Auchan)	Valdepeñas	Airén
Calle Real	Valdepeñas	Airén
Viña Albalí. Verdejo	Valdepeñas	Verdejo
Viña Marian. Verdejo	Rueda	Verdejo
Valpincia. Verdejo	Rueda	Verdejo-Viura (50:50)
Emina. Rueda	Rueda	Verdejo-Viura (80:20)
Emina. Verdejo	Rueda	Verdejo
Emina. Sauvignon	Rueda	Sauvignon Blanc
Blume. Rueda	Rueda	Verdejo-Viura
Blume. Sauvignon	Rueda	Sauvignon Blanc
Blume. Verdejo	Rueda	Verdejo
Estola. Verdejo	Valdepeñas	Verdejo
Los Molinos	Valdepeñas	Viura-Airén
Viña Espolón	Rioja	Viura
Campo Viejo	Rioja	Viura
Faustino Rivero	Rioja	Viura
Monte Esquinza (Carrefour)	Navarra	Viura
Vegas del Rivilla	Tierra de Extremadura	Macabeo-Pardina
Marqués de Riscal	Rueda	Verdejo
Viña Sol	Catalunya	Parellada
Viña Esmeralda	Catalunya	Moscatel Alejandría- Gewürztraminer (85:15)
Puerta Cerrada	Madrid	Malvar-Airén (60:40)
Batuta Chardonnay (Makro)	Tierra de Castilla	Chardonnay
Batuta Airén (Makro)	Tierra de Castilla	Airén
Batuta Macabeo (Makro)	Tierra de Castilla	Macabeo
Consigna. Chardonnay	Tierra de Castilla	Chardonnay
Añil	La Mancha	Macabeo
Viñas del Vero. Blanco	Somontano	Macabeo-Chardonnay
Viñas del Vero. Chardonnay	Somontano	Chardonnay

Tabla 9. Muestras de vinos analizadas en el estudio de clasificación a partir del perfil polifenólico

Vino	D. O./ Procedencia	Tipo de Uva
Veliterra (2 botellas)	Rueda	Verdejo
Valipincia (2 botellas)	Rueda	Verdejo
Montespina	Rueda	Verdejo
Palacio de Bornos	Rueda	Verdejo
Fray Germán	Rueda	Verdejo
Gorgorito	Rueda	Verdejo
Camino de la Dehesa	Rueda	Verdejo
Emina (2 botellas)	Rueda	Verdejo
Mayor de Castilla	Rueda	Verdejo
Blume	Rueda	Verdejo
Cuatro Rayas	Rueda	Verdejo
Señorío Real	Rueda	Verdejo
Marqués de Riscal (2 botellas)	Rueda	Verdejo
Navesur	Rueda	Verdejo
Peñasol	Desconocida	Airén
Fuente del Ritmo (2 botellas)	La Mancha	Airén
Soliera (2 botellas)	La Mancha	Airén
Castillo Delfos (2 botellas)	Valdepeñas	Airén
Calle Real	Valdepeñas	Airén
Lucía Canforrales	La Mancha	Airén
Viña Albalí	Valdepeñas	Airén
Castillo de Menara	Valdepeñas	Airén
Cepa Ineo	Valdepeñas	Airén
Cerro de los Pastores (3 botellas)	Valdepeñas	Airén
Batuta (2 botellas)	Tierra de Castilla	Airén

III.2.3. Preparación de disoluciones y muestras

Los polifenoles (reactivo sólido) se conservan a 4°C. A partir de ellos se preparan disoluciones madre de concentración $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en metanol. Estas disoluciones se conservan a 4°C durante un tiempo máximo de un mes. En los diferentes experimentos realizados en este trabajo, los patrones se preparan mediante dilución del volumen adecuado de las disoluciones madre, con el tampón de trabajo utilizado en cada uno de ellos.

Las disoluciones tampón fueron preparadas a partir del ácido correspondiente, añadiendo hidróxido sódico 1,0 M hasta el pH deseado.

Para la preparación de disolución de vino sintético se ha mezclado: ácido tartárico (0,033 M), D-glucosa (0,011 M), D-fructosa (0,011 M), NaCl (0,0030 M), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,0070 M), Na_2HPO_4 (0,011 M), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($8,1 \times 10^{-4}$ M), MnSO_4 ($2,9 \times 10^{-4}$ M), ácido acético ($8,3 \times 10^{-4}$ M) y etanol

(12% v/v). Se ha ajustado el pH a 3,60 con KOH y se ha filtrado utilizando filtros de Nylon de 0,45 μm de diámetro antes de su introducción en el sistema FIA.

Cuando se realizó el estudio del índice electroquímico mediante FIA se diluyeron las muestras de vino blanco (20 veces) y tinto (100 veces) en tampón de trabajo. Para la realización de la separación electroforética no ha sido necesario realizar ningún tratamiento de la muestra y simplemente se llevó a cabo el filtrado de las mismas con filtros de PTFE de 0,2 μm de diámetro.

III.3. PROCEDIMIENTOS

III.3.1. PREPARACIÓN DE ELECTRODOS Y DISPERSIONES

III.3.1.1. Pretratamiento de los electrodos de trabajo

Los GCE se sometieron a un pretratamiento para su acondicionamiento y regeneración antes de ser utilizados. Para ello se pulió la superficie de los electrodos de forma sucesiva con 2 suspensiones de alúmina de diámetro de partícula 0,3 y 0,05 μm , respectivamente, preparadas en agua ultrapura. El proceso de pulido se llevó a cabo sobre alfombras de pulido de fieltro durante 1 minuto con cada suspensión. A continuación los electrodos se lavaron con abundante agua ultrapura y se sometieron a tratamiento en baño de ultrasonidos con agua ultrapura durante 10 segundos, para eliminar los residuos de alúmina.

III.3.1.2. Preparación de dispersiones de nanotubos de carbono

Se han estudiado tres dispersiones de nanotubos de carbono (MWCNTs) en una mezcla de etanol/agua y en presencia de tres polímeros distintos, polilisina (PLys), polihistidina (PHys) y polietilenimina (PEI).

- *MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O)*: 1,00 mg de MWCNT se ha dispersado en 1,00 mL de una disolución de polilisina (1,00 mg/mL) en EtOH/H₂O (50:50) mediante agitación por baño de ultrasonidos durante 30 minutos.
- *MWCNT/Phys/(Acetato/EtOH)*: 1,00 mg de MWCNT se ha dispersado, en baño de ultrasonidos durante 30 minutos, en 1,00 mL de una disolución de polihistidina (0,25 mg/mL) en acetato (0,20 M) pH 5,00 y etanol (25:75).
- *MWCNT/PEI/ H₂O*: 0,50 mg de MWCNT se han dispersado en 1,00 mL de una disolución acuosa de PEI 5,00 mg/mL. Para esta dispersión se empleó una sonda de ultrasonidos durante una hora con una amplitud ajustada al 30% de su capacidad realizando ciclos sucesivos de aplicación de ultrasonidos durante 5 segundos combinados con 10 segundos de reposo.

III.3.1.3. Modificación de electrodos con nanotubos de carbono

La modificación de los electrodos con dispersiones de nanotubos de carbono se realizó depositando una gota de 10 μL de la dispersión de trabajo sobre la superficie seca del electrodo y se dejó secar al aire durante 60 minutos.

III.3.2. ESTUDIOS VOLTAMPEROMÉTRICOS DE POLIFENOLES

Estos estudios se llevaron a cabo mediante voltamperometría cíclica empleando un sistema de tres electrodos: como electrodo auxiliar una varilla de platino, como electrodo de referencia $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ 1 M y como electrodo de trabajo un GCE de 3 mm de diámetro. Estos electrodos se introdujeron en una celda de 10 mL empleando habitualmente como electrolito soporte un volumen de 5,00 mL de disoluciones tampón de acetato de diferente concentración y pH a las que se añadió NaCl 0,10 M, para fijar la fuerza iónica de la disolución cuando así fue necesario. Antes de llevar a cabo la medida en presencia de los diferentes polifenoles, se realizó un pretratamiento electroquímico a los electrodos aplicando 10 barridos de potencial entre -0,200 y 0,800 V a 0,050 V/s en electrolito soporte, para comprobar la imagen del electrodo en ausencia de los analitos. Los voltamperogramas en presencia de polifenoles se llevaron a cabo a una velocidad de barrido de 0,050 V/s. Todos los experimentos se han llevado a cabo a temperatura ambiente (20-23°C).

III.3.3. EXPERIMENTOS MEDIANTE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

En estos experimentos se ha empleado como electrolito portador tampón acetato en concentración 0,050 M y pH 4,5, al que se añadió NaCl en concentración 0,10 M. Antes de cada experimento los electrodos de trabajo han sido sometidos a pretratamiento electroquímico aplicando 10 barridos de potencial entre -0,200 y 0,800 V a 0,050 V/s en el tampón de trabajo. Las señales amperométricas han sido obtenidas fijando un potencial constante y dejando estabilizar la corriente antes de realizar las inyecciones de patrones o muestras. Todos los experimentos se han llevado a cabo a temperatura ambiente (20-23°C).

III.3.4. EXPERIMENTOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA

Todas las disoluciones y muestras introducidas al sistema de electroforesis capilar fueron filtradas previamente con filtros de PTFE de 0,2 μm de diámetro. Al comienzo de cada día de trabajo se realiza el acondicionamiento de la columna capilar. Para ello se hace pasar por orden, NaOH 1,0 M, NaOH 0,10 M, agua ultrapura y tampón de trabajo durante diez minutos cada disolución, con lavados intermedios con agua ultrapura durante dos minutos entre cada una de ellas. Al terminar una separación electroforética y antes de comenzar la siguiente se

deben realizar lavados de la columna para su reacondicionamiento, haciendo pasar NaOH de concentración 0,10 M durante dos minutos, agua ultrapura y tampón de trabajo durante cuatro minutos cada una.

Las separaciones electroforéticas se realizaron empleando diferentes tampones de separación a temperatura controlada de 25°C, típicamente con voltajes de separación entre 25 y 27,5 kV, obteniéndose corrientes de separación reproducibles.

Para llevar a cabo la detección electroquímica se ha empleado una celda electroquímica de tres electrodos: electrodo auxiliar de platino, un electrodo de pseudo-referencia de plata y un electrodo de trabajo GCE de 1 mm de diámetro. Todos ellos se ensamblan a la celda mediante tornillería y juntas de silicona. La celda también aloja un segundo electrodo de platino, empleado para establecer el voltaje de la separación electroforética. El electrolito soporte usado para rellenar la celda ha sido el tampón de la separación electroforética. Las señales amperométricas han sido obtenidas fijando un potencial constante y dejando estabilizar la corriente de detección antes de realizar la separación.

III.3.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS VINOS: pH, ACIDEZ TOTAL, CONTENIDO EN SULFITOS

III.3.5.1. pH

Para hacer las medidas de pH, se empleó un pH-metro, introduciendo directamente el electrodo en un volumen de 20 mL de muestra.

III.3.5.2. Acidez total

El ensayo de acidez total se hizo siguiendo el método indicado por el "Compendium of international methods of analysis – OIV" (Método OIV-MA-AS31-01). Este procedimiento implica la realización de una valoración que da como resultado el contenido de los ácidos presentes en el vino valorables cuando una muestra del mismo se lleva a pH 7 con una disolución alcalina. El CO₂ no está comprendido dentro de este valor de acidez total.

Para llevar a cabo este ensayo, primero debe realizarse la valoración de la disolución de NaOH 1,00 M que se va a utilizar en la alcalinización posterior del vino. Para ello se añade NaOH 1,00 M a una disolución de ftalato potásico 0,10 M en agua ultrapura comercial y valorada, empleando fenolftaleína como indicador.

Una vez determinada la concentración de NaOH, la misma se añadió gota a gota a un volumen de 10,00 mL de una muestra de vino hasta alcanzar el pH 7 medido con el pH-metro. La muestra de vino había sido previamente desgasificada con la ayuda de una bomba de vacío y mediante agitación. El volumen consumido de NaOH en este proceso se empleó en el cálculo de la acidez total del vino, expresada en g/L de ácido tartárico, utilizando para ello la siguiente expresión:

$$[\text{ácido tartárico}] = \frac{V(\text{NaOH}) \times M(\text{NaOH}) \times Pm}{m}$$

En donde V y M son el volumen consumido y la molaridad (valorada) de la NaOH respectivamente, Pm es el peso molecular del ácido tartárico y m el volumen de vino utilizado.

III.3.5.3. Contenido en sulfitos

Este ensayo se ha realizado siguiendo las especificaciones del método OIV-MA-AS323-04B del "Compendium of international methods of analysis-OIV". En él, se describen las valoraciones que se deben realizar para el análisis del sulfito libre y el combinado. La suma de ambos da el valor correspondiente al sulfito total del vino.

Sulfito libre

Se determina mediante valoración directa con iodo 0,025 M, añadiendo una disolución comercial del mismo a un volumen de 50,0 mL de vino y 5,00 mL de almidón en medio ácido (3,00 mL de ácido sulfúrico 10%), empleando AEDT para proteger al SO₂ de oxidaciones previas a la adición del iodo.

Sulfito combinado

Se determina mediante valoración con iodo 0,025 M a una muestra a la que previamente se ha realizado una hidrólisis alcalina. Para ello, a una mezcla a la que se ha realizado previamente la valoración del sulfito libre, se debe adicionar 8,00 mL de NaOH 4,00 M, agitar y dejar reposar 5 minutos. Al cabo de este tiempo, y con agitación vigorosa, esta mezcla se echa de una sola vez en un matraz Erlenmeyer que contiene 10,00 mL de ácido sulfúrico y se lleva a cabo una segunda valoración con iodo 0,025M.

Se realiza una tercera valoración en la cual se determina también el sulfito combinado remanente, añadiendo a la mezcla resultante de la segunda valoración 20,00 mL de NaOH 4,0 M, se deja reposar 5 minutos y se diluye con 200,0 mL de agua ultrapura – hielo. Esta disolución se añade agitando vigorosamente y de una sola vez a un matraz Erlenmeyer que contiene un volumen correspondiente a 30,0 mL de ácido sulfúrico al 10% y se lleva a cabo la valoración con iodo 0,025 M.

Para la determinación del contenido en sulfito total, se suman los volúmenes de iodo consumidos en las tres valoraciones anteriores y se obtiene el valor (expresado en mg·L⁻¹ de SO₂) mediante el empleo de la siguiente ecuación:

$$SO_2 = 32 \times (n + n' + n'')$$

En donde n, n' y n'' son los volúmenes consumidos de disolución de iodo 0,025 M comercial en cada valoración.

III.3.6. ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

III.3.6.1. Índice Folin-Ciocalteu

Los resultados de este ensayo se dan en equivalentes de ácido gálico y por lo tanto la curva de calibración se prepara con este compuesto. Para ello, se han tomado los volúmenes adecuados de la disolución madre y se ha añadido primero 0,50 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Un minuto después se han añadido 2,00 mL de Na_2CO_3 al 20% y se ha llevado a un volumen de 10,00 mL con agua ultrapura. El mismo proceso se ha repetido en el caso de las muestras, añadiendo los reactivos a 1,00 mL de vino diluido 10 veces. Se ha medido el complejo azul formado a 755 nm, empleando cubetas con un paso óptico de 10 mm.

III.3.6.2. Absorbancia a 280 nm

Se diluyó el vino con agua destilada 20 veces el blanco y 100 veces el tinto y se midió la absorbancia a 280 nm, empleando cubetas con un paso óptico de 10 mm. Los resultados se dan como:

$$IPT(280) = A \times F.D$$

Donde A es la absorbancia y $F.D$ el factor de dilución.

III.3.6.3. Ensayo de color

Para los vinos tintos se ha medido la absorbancia correspondiente a las longitudes de onda 420, 520 y 620 nm empleando cubetas con un paso óptico de 10 mm (vinos blancos) y 5 mm (vinos tintos). El índice de color es la suma de las tres absorbancias. En el caso de los vinos blancos se ha medido la absorbancia a las longitudes de onda de 420 y 520 nm. El índice de color es el valor correspondiente a la suma de las dos absorbancias obtenidas. El ensayo se realizó, en ambos casos, sin dilución previa de las muestras.

III.3.6.4. Ensayo del DMACA para flavanoles

Los resultados de este ensayo se dan en equivalentes de (+)-catequina y por lo tanto la curva de calibración se prepara con este reactivo. Para ello, se añadió, a los volúmenes adecuados de disolución madre de (+)-catequina, y siguiendo estrictamente este orden, un volumen de 5,00 mL de la mezcla del reactivo DMACA (0,1%) con ácido clorhídrico (2,4 M) y metanol, enrasando con metanol hasta un volumen de 10,00 mL. Transcurridos 15 minutos, necesarios para la formación del complejo de color verde, se midió la absorbancia a 640 nm. El mismo proceso se ha empleado para la muestra, tomando un volumen de 0,10 mL de vino.

III.3.6.5. Ensayo del aluminio para flavonoides

Los resultados de este ensayo se dan en equivalentes de (+)-catequina. El procedimiento de análisis para flavonoides totales se hace midiendo la absorbancia a 510 nm del complejo coloreado que se forma inmediatamente después de añadir a la muestra tricloruro de aluminio en presencia de nitrito sódico. El orden de adición de los reactivos es importante para que se produzca la formación del compuesto coloreado y debe hacerse de la siguiente manera:

1. Volumen adecuado de disolución madre de (+)-catequina para la preparación de patrones de diferente concentración, o en su caso, 0,50 mL de muestra de vino.
2. 2,00 mL de tampón acetato amónico 0,10 M.
3. 3,60 mL de agua.
4. 0,30 mL de nitrito sódico. Esperar cinco minutos.
5. 0,60 mL de tricloruro de aluminio. Esperar seis minutos.
6. Enrasar a 10,0 mL con hidróxido sódico.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**IV.1. DETERMINACIÓN DE
COMPUESTOS POLIFENÓLICOS
UTILIZANDO UN SISTEMA FIA CON
DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA**

**IV.1.1. INTRODUCCIÓN: TÉCNICAS
ELECTROQUÍMICAS, DESCRIPCIÓN DE UN
SISTEMA FIA Y ELECTRODOS
MODIFICADOS CON NANOTUBOS DE
CARBONO**

IV.1.1.1. QUÍMICA ELECTROANALÍTICA

Las técnicas electroanalíticas son un grupo de técnicas instrumentales de análisis químico que permiten obtener información de interés analítico, principalmente de tipo cuantitativo, basadas en las propiedades eléctricas de una disolución de analito cuando ésta forma parte de una celda electroquímica. Así, mediante el seguimiento de procesos de transporte de sustancias cargadas en el seno de la disolución o bien de reacciones electroquímicas de transferencia de electrones en la interfase entre un electrodo y la disolución, es posible obtener información analítica gracias a la relación entre parámetros eléctricos, tales como potencial, corriente y carga, con parámetros químicos. Actualmente, las técnicas electroanalíticas de mayor interés son aquellas que se basan en reacciones electroquímicas.

Una reacción electroquímica es la transformación química que sufre una sustancia en la interfase electrodo/disolución como consecuencia del paso de una corriente eléctrica generada de forma espontánea (proceso galvánico) o inducida externamente (proceso electrolítico). La transformación supone una ganancia o pérdida de electrones de la molécula original, cuyos procesos se denominan reducción y oxidación respectivamente. La gran parte de las técnicas electroanalíticas utilizan procesos electrolíticos, en los cuales el electrodo actúa como conductor de electrones, mientras que la disolución electrolítica permite el transporte de las sustancias que se van a electrolizar desde la disolución hasta los electrodos. Por tanto, en el proceso de electrólisis, la disolución se comporta como conductor iónico mientras el electrodo es el conductor electrónico. En este proceso además se produce un consumo de sustancia en la interfase electrodo/disolución, por lo que es necesario que la sustancia siga llegando desde la disolución al electrodo para que el proceso no se vea interrumpido y que el producto de electrólisis realice el camino inverso, del electrodo a la disolución^{1, 2}.

El montaje instrumental empleado habitualmente para llevar a cabo un experimento basado en una técnica electroanalítica consta de una célula electroquímica, un generador de energía eléctrica, conductores y aparatos de control o medida. Además, generalmente es necesario que la disolución donde se encuentra el analito contenga electrólitos inertes. La celda electroquímica está compuesta por al menos dos electrodos: uno de ellos responde a la reacción del analito y se denomina electrodo de trabajo o indicador mientras que el otro tiene un potencial constante e independiente de las propiedades de la disolución de electrolito y se denomina electrodo de referencia. Éste permite medir el potencial del electrodo de trabajo y equilibra los electrones añadidos o eliminados por el mismo. Existen celdas de tres electrodos en las cuales el papel del electrodo de referencia se ha dividido. En ellas sólo actúa como controlador del potencial del electrodo de trabajo mientras un tercer electrodo, denominado auxiliar, pasa toda la corriente necesaria para equilibrar la producida por el electrodo de trabajo³.

La IUPAC ha establecido la siguiente clasificación de las técnicas electroanalíticas⁴, recogidas en la tabla 10:

Tabla 10. Clasificación de la IUPAC de las técnicas electroanalíticas

Potenciometría y técnicas relacionadas	Potenciometría
	Potenciometría diferencial
	Titrición potenciométrica
	Titrición potenciométrica diferencial
	Potenciometría de corriente controlada
	Titrición potenciométrica a corriente controlada
	Cronopotenciometría
	Titrición culombimétrica
Amperometría y técnicas relacionadas	Amperometría
	Titrición amperométrica
	Cronoamperometría
	Cronoculombimetría
	Electrogravimetría
	Electrografía
	Culombimetría de potencial controlado
	Electrogravimetría de potencial controlado
Voltamperometría y técnicas relacionadas	Voltamperometría de barrido lineal, voltamperometría de electrodo estacionario o cronamperometría con barrido lineal de potencial
	Voltamperometría hidrodinámica
	Polarografía
	Polarografía TAST
	Polarografía de gota de barrido simple
	Voltamperometría de onda triangular
	Voltamperometría cíclica
	Polarografía normal de pulso
	Cronoamperometría de doble potencial
	Polarografía diferencial de pulso
	Polarografía de corriente alterna
	Polarografía de onda cuadrada
	Cronopotenciometría de voltaje alterno
	Conductimetría
Impedancia o conductancia y técnicas relacionadas	Titrición conductimétrica
	Conductimetría de elevada frecuencia
	Titrición conductimétrica de elevada frecuencia
	Dielectrometría
	Titrición dielectrométrica

Las dos formas principales de realizar medidas electroanalíticas son la potenciometría a corriente controlada y la medida de corriente a potencial controlado. La modalidad más utilizada de potenciometría es a corriente igual a cero en la cual la información sobre la composición de una muestra se obtiene de la medida de potencial establecido a través de una membrana de un electrodo selectivo. Por su parte, las medidas a potencial controlado implican una serie de técnicas amperométricas y voltamperométricas en las cuales se estudian procesos de transferencia de carga en la interfase electrodo/disolución que dan lugar a una reacción electroquímica en sustancias electroactivas. Dependiendo del potencial impuesto, estos procesos se darán en mayor o menor proporción y de la medida de la corriente eléctrica producida en ellos será posible obtener información de especies electroactivas o de especies

que no lo son si antes se realiza algún procedimiento de derivatización directo o indirecto. Conociendo la reactividad de los grupos funcionales de las especies es posible predecir su electroactividad.

La mayoría de las técnicas amperométricas y voltamperométricas a potencial controlado ofrecen ventajas tales como:

- Elevada sensibilidad.
- Elevada selectividad hacia especies electroactivas.
- Amplio intervalo lineal.
- Instrumentación sencilla, fácilmente portable y de bajo coste.
- Bajos límites de detección con volúmenes pequeños de muestra (5-20 μL).

Durante el desarrollo experimental de esta Tesis se han utilizado la voltamperometría cíclica y la amperometría para realizar todas las medidas electroanalíticas, empleando esta última técnica para llevar a cabo la detección electroquímica tanto en un sistema FIA como en un equipo de electroforesis capilar. En las siguientes secciones se realizará una descripción más detallada de estas dos técnicas electroanalíticas, así como del funcionamiento de un sistema FIA y las características del acoplamiento de un detector amperométrico a él. La revisión de los fundamentos de las separaciones electroforéticas y las particularidades en el acoplamiento y uso de detectores electroquímicos a equipos de electroforesis capilar se desarrollarán en el apartado IV.2.

IV.1.1.2. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

La voltamperometría cíclica es la técnica electroanalítica más empleada para obtener información cualitativa sobre los procesos electroquímicos de una molécula. Con ella se obtiene información sobre la termodinámica de los procesos redox, cinética de las reacciones de transferencia de carga, reacciones químicas acopladas y procesos de adsorción. Normalmente es la técnica que se emplea al inicio de los estudios electroquímicos de un nuevo sistema.

Los experimentos voltamperométricos se realizan empleando un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar sumergidos en una disolución no agitada (en reposo) del analito en presencia de un electrolito inerte, que proporcione la conductividad suficiente. La información sobre el analito se obtiene a partir de medidas de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, mediante un potencióstato. La señal de intensidad que fluye por el electrodo está provocada por una señal de excitación triangular que sigue el esquema que se muestra en la figura 1. En él, se observa que el potencial aplicado varía linealmente en el tiempo desde un valor inicial, E_i , hasta alcanzar un valor E_λ , denominado potencial de inversión, en el cual se invierte la dirección del barrido hasta alcanzar un potencial final E_f . El barrido de potencial se termina al final del primer ciclo o puede continuarse realizando ciclos sucesivos⁵.

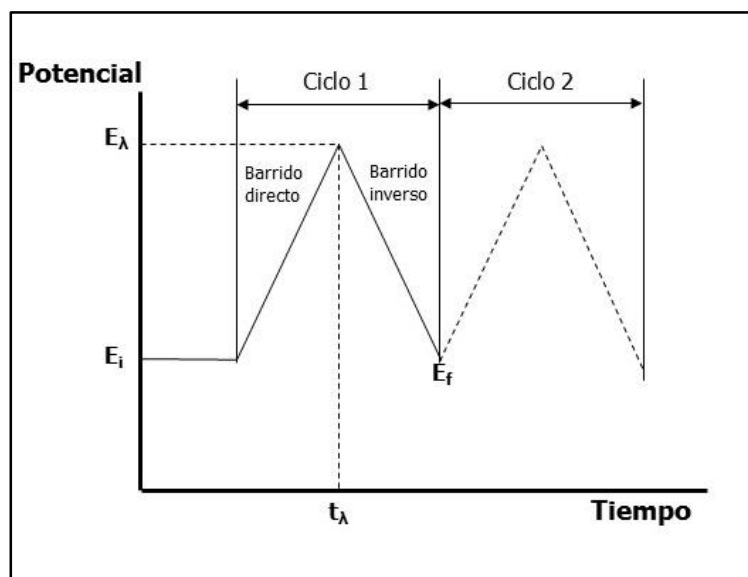


Figura 1. Excitación de señal típica de voltamperometría cíclica: función de onda de potencial triangular

La representación gráfica de la corriente obtenida en función del potencial se denomina voltamperograma cíclico y, cuando la reacción electroquímica es reversible, tiene una forma similar a la que se muestra en la figura 2, que representa un proceso sencillo de oxidación de una sustancia R y la correspondiente reducción del producto oxidado presente en el electrodo.

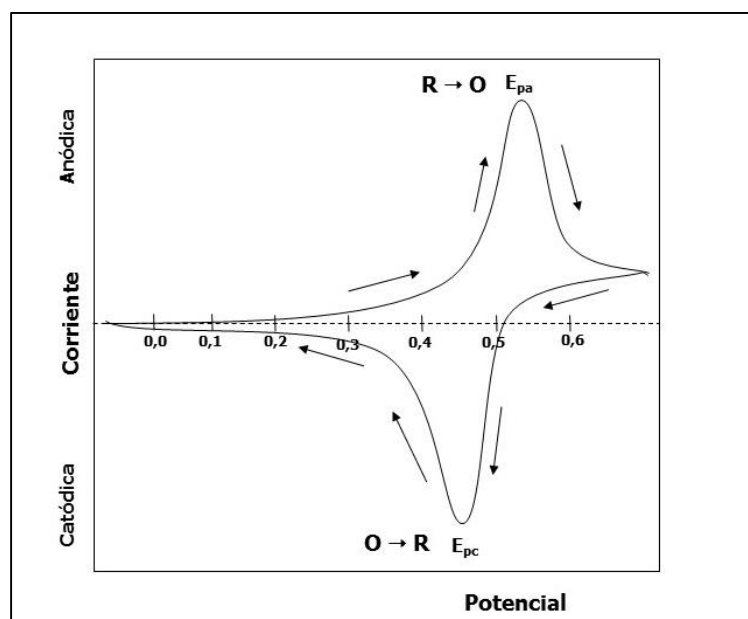


Figura 2. Voltamperograma cíclico para un proceso electroquímico de oxidación reversible de una sustancia R.

Durante el barrido directo (en esta representación el sentido es positivo), se alcanza un valor de potencial suficiente para producir la reacción redox (en este ejemplo es de oxidación) de la

especie presente en la disolución (en este caso R). La electrólisis de R en la superficie del electrodo de trabajo genera un gradiente de concentración en las proximidades que moviliza moléculas de R desde el seno de la disolución (transporte por difusión) para restablecer la concentración original de R en la superficie del electrodo. Esta oxidación electroquímica produce una corriente anódica que aumenta rápidamente al variar el potencial aplicado hasta que la concentración de la especie R en la superficie del electrodo se aproxima a cero. En este momento, la corriente alcanza un máximo (intensidad o corriente de pico) a un potencial característico del analito en las condiciones experimentales (potencial de pico). A partir de entonces el transporte por difusión no puede reponer suficiente R y la corriente comienza a decaer al seguir variando el potencial. Tras la inversión de la dirección del barrido de potencial, la oxidación de R que consigue llegar al electrodo prosigue hasta que el potencial aplicado se hace lo suficientemente negativo como para que la oxidación se detenga y comience a producirse la reducción de la especie O acumulada en las cercanías de la superficie del electrodo. De la misma manera que antes, se produce un aumento de corriente, ahora catódica, hasta que la concentración de O acumulada en la superficie del electrodo termina por reducirse. Igual que en el proceso de oxidación se forma un pico que posteriormente disminuye. Por tanto, la voltamperometría cíclica es capaz de generar rápidamente una nueva especie durante el barrido directo y comprobar su existencia en el barrido inverso y este hecho la hace una herramienta poderosa en el estudio de las reacciones electródicas.

Los parámetros de interés en voltamperometría cíclica son las magnitudes de las intensidades de pico, I_{pa} e I_{pc} , su relación, I_{pa}/I_{pc} , y la separación entre los potenciales de pico ΔE_p . En el caso de un sistema reversible ΔE_p viene determinado por la ecuación 1:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{59}{n} mV$$

Ecuación 1. Separación de los potenciales de pico para un sistema reversible

En donde n es el número de electrones intercambiados en el proceso electroquímico y E_{pa} y E_{pc} los potenciales anódico y catódico respectivamente medidos en mV.

El potencial intermedio entre los dos potenciales de pico es el valor del potencial formal del par redox y viene determinado por la ecuación 2:

$$\Delta E^{0'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

Ecuación 2. Potencial formal del par redox en un sistema reversible

Las intensidades de pico están definidas por la ecuación de Randles-Sevcik que, a 25°C, viene expresada por la ecuación 3:

$$I_p = (2,69 \cdot 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C$$

Ecuación 3. Expresión de la intensidad de pico en un sistema reversible

Donde I_p se expresa en amperios, n es el número de electrones intercambiados en el proceso electroquímico, A es el área efectiva del electrodo (cm^2), D el coeficiente de difusión de la sustancia electroactiva ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), v la velocidad de barrido (V s^{-1}) y C la concentración de la especie electroactiva en el seno de la disolución (mol cm^{-3}). Esta expresión muestra la relación directa entre la intensidad de pico y la concentración de sustancia electroactiva, útil desde el punto de vista analítico, así como su dependencia con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, característica de procesos electroquímicos en los que el transporte de masa al electrodo durante el experimento voltamperométrico se realiza únicamente por difusión. Los valores para las intensidades en un sistema reversible son iguales y su cociente es igual a la unidad, independientemente de la velocidad de barrido de potencial. Valores diferentes de 1 para el cociente, son consecuencia de complicaciones cinéticas o de otro tipo en el proceso electródico.

En el caso de sistemas irreversibles y cuasirreversibles, la ecuación 1 no es aplicable, la separación entre picos toma un valor mayor que $59/n \text{ mV}$ y además es dependiente de la velocidad de barrido de potencial. Además, para los sistemas irreversibles puede no observarse pico en el barrido inverso. Por su parte la ecuación 3 se modifica para introducir en ella el coeficiente de transferencia de carga, término que caracteriza el grado de irreversibilidad, pero mantiene la misma dependencia frente al área, coeficiente de difusión, velocidad de barrido y concentración. La irreversibilidad también afecta a la relación de intensidades, ya que a medida que esta aumenta, disminuye la corriente de pico en el sentido inverso.

Los procesos físicos (por ejemplo adsorción de reactivos o productos a la superficie del electrodo) o químicos (típicamente reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia electrónica) que puedan suceder antes o después de la reacción electroquímica pueden alterar la concentración de especie electroactiva en la superficie del electrodo y dar lugar a cambios en la forma de los voltamperogramas que aportan información cualitativa sobre el esquema de reacciones que se producen.

IV.1.1.3. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

IV.1.1.3.1. Sistema de inyección en flujo (FIA)

El sistema de inyección en flujo básico está formado por una bomba peristáltica unida a una válvula de seis vías con dos posiciones y ésta, a su vez, conectada a un sistema de detección, típicamente de tipo espectrofotométrico o electroquímico. Las uniones entre los distintos componentes del sistema se hacen generalmente mediante tubos de teflón con un diámetro interno comprendido entre 0,3 y 0,8 mm. En la figura 3 se muestra un esquema del sistema FIA con detección electroquímica similar al empleado en esta Tesis. La bomba peristáltica hace fluir la disolución de electrolito portador por todo el sistema y permite transportar la muestra hasta el sistema de detección. La válvula de inyección permite introducir volúmenes discretos de muestra al sistema de manera muy reproducible. Cuando está en la posición de carga (posición 1 en la figura 3), se introduce la muestra en un bucle de carga con la ayuda de una

jeringa. En el cambio a posición de inyección (2 en la figura 3), el electrolito portador arrastra la muestra del bucle hasta el detector.

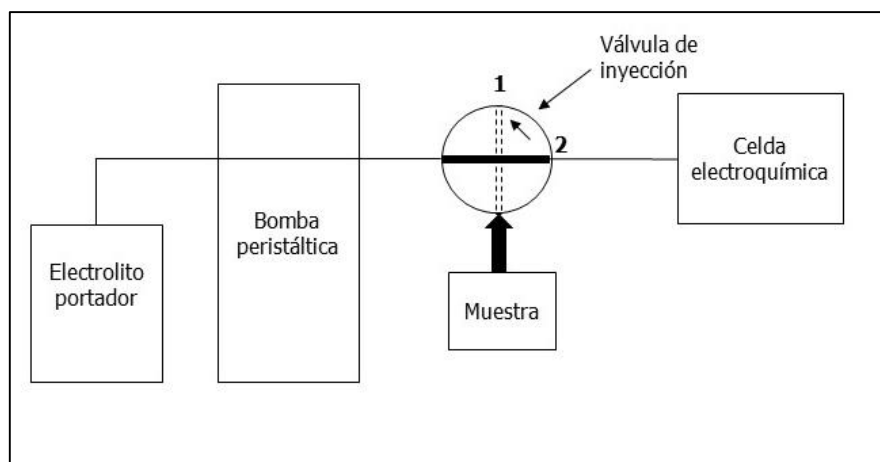


Figura 3. Esquema de un sistema FIA con detección electroquímica

El flujo en un sistema FIA es de tipo laminar lo cual confiere algunas características a su funcionamiento que pueden resultar ventajosas:

- Zona de muestra bien definida.
- Caudales reducidos y por lo tanto menor consumo de reactivos.
- Elevada frecuencia de muestreo.

Durante el tiempo en que el volumen de muestra es transportado al detector, se produce un proceso de dilución (dispersión) en las zonas donde se une a la disolución de electrolito portador. De esta forma se genera un gradiente de concentración a lo largo de todo el volumen de muestra cuyo desarrollo dependerá del tiempo de residencia en el sistema. En las condiciones de trabajo habituales en FIA, la dispersión en la zona ocupada por la muestra viene controlada por dos mecanismos que contribuyen simultáneamente: transporte por convección y transporte por difusión⁶. El transporte por convección en flujo laminar produce un perfil de velocidad parabólico en el interior de los tubos del sistema, en donde la velocidad lineal de las moléculas en las paredes del tubo es igual a cero mientras las que se encuentran en el centro viajan al doble de la velocidad media. El transporte por difusión se debe a la formación de gradientes de concentración en diferentes momentos del transporte por convección y su contribución a la dispersión se hace más importante cuanto mayor sea el tiempo de residencia de la muestra en el sistema FIA.

La señal obtenida en un sistema FIA es un reflejo del movimiento de la zona de muestra, claramente definida y sujeta a los procesos de dispersión, que genera en consecuencia una señal transitoria en el tiempo con forma de pico cuando pasa por el detector. El perfil de estas señales, por tanto, dependerá del tiempo que este volumen de muestra pase dentro del sistema, haciendo de la velocidad de flujo, volumen de muestra inyectado y longitud del capilar utilizados factores muy importantes a controlar para obtener una buena forma del pico⁶.

IV.1.1.3.2. Detección amperométrica

Los detectores electroquímicos acoplados a sistemas FIA son en su amplia mayoría de tipo potenciométrico (basados en el uso de electrodos selectivos) o de tipo amperométrico (basados en el seguimiento de las reacciones electroquímicas de interés que se producen en un electrodo de trabajo apropiado). En este apartado se tratará específicamente la detección de tipo amperométrico al ser la utilizada en los trabajos realizados en esta Tesis.

La instrumentación empleada en un sistema de detección amperométrico es barata y sencilla ya que simplemente consta de una celda de flujo con tres electrodos (trabajo, referencia y auxiliar), un potenciostato y un ordenador. Los detectores amperométricos operan manteniendo un potencial fijo en el electrodo de trabajo mientras se registra la corriente en función del tiempo. En un sistema FIA se obtienen señales en forma de un pico cuya altura indica la intensidad de corriente que se relaciona con la concentración del analito o analitos de interés.

Este tipo de detección se usa para el análisis de especies que sufren procesos de oxidación o reducción a potenciales moderados. Cuando se trabaja a un potencial muy elevado, la corriente de fondo aumenta y como consecuencia la relación señal/ruido disminuye. Además, se empeora la selectividad del método puesto que se puede detectar un número mayor de especies que con potenciales menores. Por ello la elección del potencial de trabajo para una especie es clave y se hace habitualmente mediante la realización de un voltamperograma hidrodinámico. Para ello se realizan inyecciones sucesivas de disolución de analito a diferentes potenciales y se registra la corriente de pico obtenida en cada caso. La representación de la corriente frente al potencial dará lugar a una curva sigmoideal y el potencial elegido debe corresponderse con la zona límite de la meseta de dicha curva, tal y como se muestra en la figura 4:

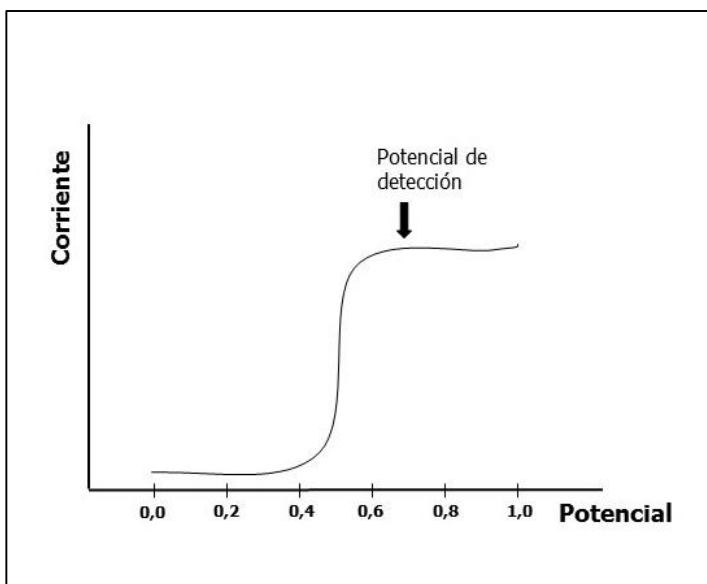


Figura 4. Ejemplo de un voltamperograma hidrodinámico

IV.1.1.3.3. Celda electroquímica

El diseño de una celda acoplada a un sistema de flujo debe cumplir una serie de requisitos, entre ellos:

- Elevada relación señal/ruido.
- Volumen muerto pequeño.
- Comportamientos hidrodinámicos bien definidos.
- Construcción y mantenimiento sencillos.

Las celdas más usadas tienen dos tipos de configuración: tipo “thin-layer” y “wall-jet”³. En las celdas que emplean la primera configuración, la disolución portadora fluye paralela a la superficie plana del electrodo de trabajo, que está incrustado en un canal rectangular. Por el contrario, en aquellas con la segunda configuración la disolución portadora incide de forma perpendicular a la superficie del electrodo de trabajo y se extiende posteriormente sobre ésta radialmente. En la figura 5 se muestra un esquema de cada una de ellas:

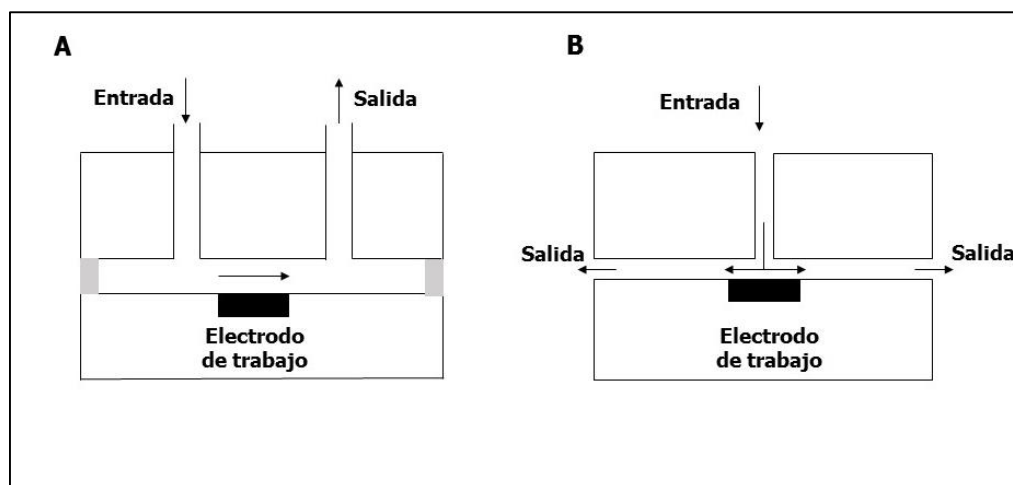


Figura 5. Configuración de celdas de flujo tipo thin-layer (A) y wall-jet (B)

En la realización de esta Tesis se ha empleado la configuración tipo “wall-jet”. En ella, la señal depende del diámetro del canal de entrada de la disolución portadora y también de la velocidad lineal del flujo de disolución por lo que se deben tener en cuenta algunas consideraciones. Entre ellas debe evitarse que el flujo de disolución portadora se divida antes de su llegada a la superficie del electrodo y, por tanto, la posición del mismo en la celda (distancia a la que se encuentra respecto al canal de entrada) es un factor clave. Además, el diámetro del electrodo de trabajo debe ser al menos diez veces superior al diámetro del canal de entrada⁷.

IV.1.1.4. ELECTRODO DE TRABAJO

Las metodologías electroanalíticas basadas en la medida de una corriente que fluye por un electrodo inducida por una reacción electroquímica en la interfase electrodo/disolución tras una perturbación en el potencial aplicado, como es el caso de la voltamperometría cíclica y la amperometría a potencial fijo, quedan supeditadas a la eficacia del funcionamiento del electrodo de trabajo empleado para estos fines. En general, se espera que el electrodo de trabajo utilizado en estos experimentos actúe como transmisor eficaz del flujo de electrones implicados en el proceso electroquímico entre el circuito eléctrico externo y la disolución. Además debe proporcionar una elevada relación señal/ruido y dar lugar a respuestas estables y/o reproducibles. Por lo tanto la naturaleza del material con el que se fabrica el electrodo de trabajo y el estado en el que se encuentre la superficie expuesta a la disolución influirá decisivamente en la sensibilidad, selectividad y eficacia de la metodología analítica asociada.

Los materiales empleados para la fabricación de electrodos de trabajo han sido tradicionalmente metales como el Hg, Pt o Au, así como diversas formas de carbono. Los electrodos metálicos suelen ser eficaces en intervalos de potenciales limitados y su funcionamiento está claramente influenciado por la formación, deliberada o accidental, de óxidos en su superficie. Los electrodos de trabajo elaborados con materiales de carbono (carbono vítreo, grafito, diamante) son utilizados ampliamente en la actualidad por sus excelentes propiedades electroquímicas, gran versatilidad y coste moderado. Permiten el seguimiento de procesos electroquímicos tanto de reducción como, especialmente, de oxidación dado que su ventana de potenciales es bastante amplia en presencia de los electrolitos soporte habituales y en todo el rango de pH. Estos materiales ofrecen la posibilidad de fabricar electrodos de diversas formas (generalmente discos) y tamaños (desde 10 mm hasta 10 μm) y pueden combinarse con otros materiales inertes (típicamente aglutinantes como silicona o aceite mineral) para la formación de compósitos. Además es posible emplear múltiples procedimientos de modificación, tanto físicos como químicos, de su superficie para incorporar catalizadores, receptores moleculares o material biológico que amplían las posibles aplicaciones electroanalíticas, mejorando habitualmente la selectividad y sensibilidad. La incorporación de nuevos nanomateriales de carbono, como los nanotubos de carbono o el grafeno, a dispositivos electroquímicos suscita en la actualidad un gran interés ya que pueden mejorar las prestaciones ofrecidas hasta el momento por sus homólogos a escala macrométrica. A continuación se describen los electrodos fabricados con materiales de carbono empleados en esta Tesis Doctoral:

IV.1.1.4.1. Electrodo de glassy carbon (GCE)

El glassy carbon o carbón vítreo es un material que presenta propiedades mecánicas y eléctricas muy buenas para ser utilizado como electrodo de trabajo con fines electroanalíticos, ya que proporciona una amplia ventana de potencial y además es inerte químicamente. La estructura microscópica de este material presenta capas, hilos o láminas de grafito fuertemente entrecruzadas, que impide la penetración de gases y líquidos hacia su interior. Esta estructura impide que el material sea atacado químicamente con facilidad y origina que las reacciones

electroquímicas de oxidación y/o reducción de agua y oxígeno necesiten altos sobrepotenciales.

Previo al trabajo con un electrodo de este tipo, es necesario realizar un tratamiento de activación y/o regeneración de su superficie en el cual, al menos, se realiza el pulido de la superficie con alúminas de diferente tamaño de diámetro de partícula sobre alfombras de pulido, y cuyos residuos deben eliminarse. Además de este, pueden ser necesarios otros pasos adicionales para activar la superficie, por ejemplo mediante el uso de un método electroquímico. La respuesta obtenida depende de este proceso de activación, lo cual hace que en ocasiones sea muy difícil obtener una buena reproducibilidad con este electrodo³.

IV.1.1.4.2. Electrodos basados en nanotubos de carbono

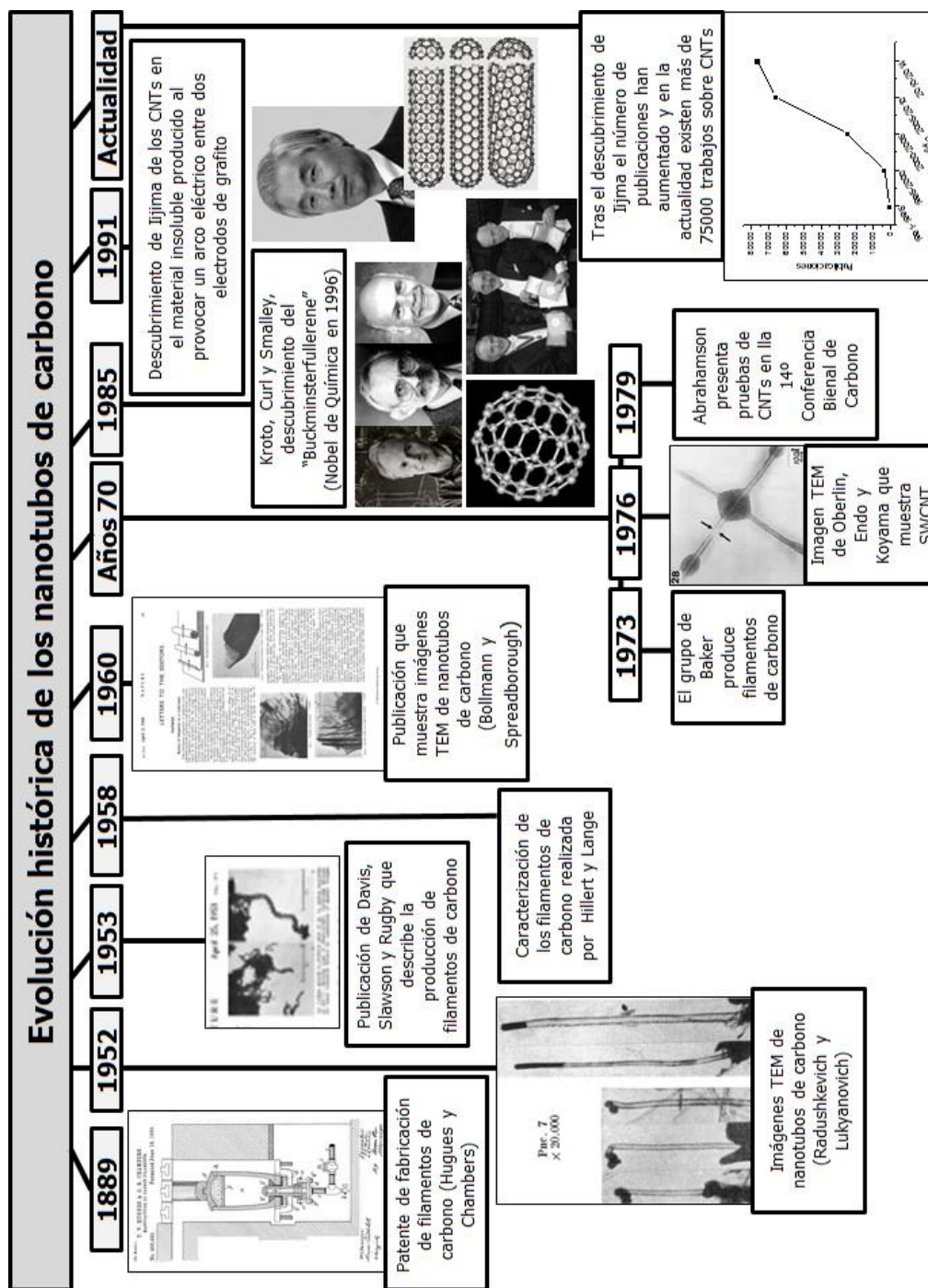
Los nanotubos de carbono (CNTs) son una forma de carbono compuesta por láminas de grafito enrolladas sobre sí mismas cuyo diámetro es de orden nanométrico. Se podría decir que los primeros estudios relacionados con los nanotubos de carbono se remontan al año 1889 con la publicación de una patente (Hugues y Chambers⁸), en la que se muestra el procedimiento de fabricación de filamentos de carbono utilizando como gases precursores hidrógeno y metano en un crisol de hierro. Aunque en muchos casos se otorga a Iijima el descubrimiento de los nanotubos de carbono, son varios los investigadores que reclaman⁹ que éste sea atribuido a L. V. Radushkevich y V. M. Lukyanovich, quienes ya en el año 1952 publicaron unas imágenes en las que se pueden observar tubos de carbono de diámetro nanométrico¹⁰. El hecho de que el trabajo fuera publicado en ruso, y la situación política de la época entre la Unión Soviética y el resto de países, provocaron que no se diera suficiente importancia a estos estudios. Un año más tarde, coincidiendo con el desarrollo del microscopio electrónico, Davis, Slawson y Rugby¹¹ describieron la producción de filamentos de carbono a partir de la desproporción de CO catalizada por hierro. Estos filamentos presentaban forma helicoidal y diámetro entre 100 y 200 nm y fueron caracterizados posteriormente, en el año 1958, por Hillert y Lange¹² como elementos con una estructura altamente gráfica. En 1960, Bollmann y Spreadborough¹³ publicaron unas imágenes de microscopía electrónica (TEM) que claramente mostraban estructuras de MWCNT, en un trabajo sobre el estudio de las propiedades de fricción del carbono debido a las láminas de grafito. En la década de los setenta se realizaron estudios con una mayor profundidad en la generación de filamentos de carbono por procesos catalíticos a partir de hidrocarburos como precursores y empleando catalizadores metálicos como por ejemplo Fe, Co o Ni. De entre estos trabajos cabe destacar, en primer lugar, el que realizó el grupo de RTK Baker¹⁴ en 1973, en el cual se emplearon mezclas de acetileno e hidrógeno con catalizadores de diferentes metales (Ni, Fe, Co, Cr) definiendo el material obtenido como "filamentos de carbono". En el año 1976, un trabajo de Oberlin, Endo, y Koyama¹⁵ mostró las fibras huecas de carbono a escala nanométrica, utilizando una técnica de crecimiento por vapor o CVD (Chemical Vapor Deposition). Además, los autores mostraron una imagen TEM de un compuesto de nanotubos de una sola pared de grafito. Más adelante Endo se referiría a ella como un nanotubo de pared simple o monocapa (SWCNT). En el año 1979 John Abrahamson¹⁶ presentó pruebas de nanotubos de carbono en la 14ª Conferencia Bienal de Carbono en la Universidad Estatal de Pennsylvania. Durante el evento se describieron los nanotubos de carbono como las fibras de carbono que se producen en ánodos del mismo compuesto durante

una descarga por arco. Además, se planteó la caracterización de estas fibras y la hipótesis para su crecimiento en una atmósfera de nitrógeno a baja presión. En 1985, Kroto, Curl y Smalley¹⁷ descubrieron el "Buckminsterfullerene", material que posee 60 carbonos unidos formando una estructura de balón. Hoy en día se clasifica dentro de la familia de los Fullerenos: moléculas formadas por átomos de carbono en forma de esferas huecas, elipsoides o tubos. En 1987 se concedió la patente en Estados Unidos a Howard G. Tennent de Hyperion Catálisis¹⁸, por la producción de "fibrillas discretas cilíndricas de carbono". Estas fibrillas tienen un diámetro de entre 3,5 y 70 nanómetros aproximadamente, una longitud de 100 veces el diámetro interno y una región externa de multicapas, formadas por átomos de carbono ordenados, dispuestas de forma concéntrica al eje del cilindro que forma la fibra. El descubrimiento de Iijima¹⁹ de los nanotubos de carbono en el material insoluble producido al provocar un arco eléctrico entre dos electrodos de grafito, dio lugar a un importante aumento en la investigación de estos materiales. Los estudios se intensificaron tras los trabajos independientes de Bethune²⁰ de IBM y de Iijima²¹ de NEC en los que se describe la síntesis de nanotubos de carbono mediante la aplicación de la deposición catalítica en fase de vapor (CVD). En los últimos años ha aumentado notablemente el número de publicaciones científicas en las cuales se describen diferentes modificaciones de electrodos de trabajo empleando CNTs²². En la figura 6 se muestra un esquema de la evolución histórica en la investigación con nanotubos de carbono.

Existen varias clasificaciones de nanotubos de carbono en función de diferentes características, una de ellas el número de láminas de grafito que poseen. Así, se distingue entre los Single-Walled Carbon Nanotubes, (SWCNT) cuando presentan una capa, Double-Walled Carbon Nanotubes (DWCNT) cuando poseen dos y los Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNT) cuando tienen un número mayor de dichas láminas enrolladas en forma de tubos concéntricos²³. Este material presenta determinadas ventajas frente a las formas de carbono ya conocidas hasta el momento como por ejemplo el grafito o el carbón vítreo. Entre ellas cabe destacar su elevada conductividad y área específica. Estas dos propiedades son especialmente importantes en la aplicación de electrodos modificados con nanotubos de carbono al estudio de reacciones electroquímicas, dando lugar a potenciales de reacción electroquímica más bajos, así como a un aumento en la intensidad de corriente de las señales producidas por las sustancias que están implicadas en la reacción redox²⁴.

El principal problema que se presenta cuando se emplean nanotubos de carbono para hacer dispersiones y modificar electrodos de GCE es su baja solubilidad en disolventes acuosos, lo que obliga a hacer uso de disolventes orgánicos que generan residuos de mayor toxicidad. Para solventar este inconveniente, se han estudiado diferentes agentes que ayudan a aumentar su solubilidad en una matriz acuosa. Un ejemplo de ellos es el empleo de polímeros y es lo que se ha utilizado para el desarrollo de esta Tesis.

Figura 6. Evolución histórica de los nanotubos de carbono



IV.1.2. RESULTADOS: OPTIMIZACIÓN DE LA DISPERSIÓN Y CONDICIONES DEL ELECTROLITO SOPORTE

IV.1.2.1. DISPERSIONES DE NANOTUBOS DE CARBONO EN POLÍMEROS

El primer objetivo de esta Tesis es la incorporación de nanotubos de carbono a la superficie de electrodos de glassy carbon (GCE). Una de las maneras más sencillas y utilizadas con frecuencia para ello es la formación de una capa de nanotubos de carbono sobre la superficie de un GCE a partir de una dispersión de estos nanomateriales. La estrategia empleada habitualmente es la deposición de un volumen determinado de dicha dispersión que posteriormente se deja secar al aire hasta la evaporación completa del disolvente. Para obtener recubrimientos de la superficie del electrodo útiles para su uso en electroanálisis es importante que las dispersiones de partida sean homogéneas y estables. Este es uno de los mayores retos que se presentan cuando se trabaja con nanotubos de carbono puesto que su naturaleza hidrofóbica hace que sea complicada su dispersión en medios acuosos. Para lograr dispersar estos nanomateriales en estas condiciones y evitar la posterior formación de agregados, una práctica habitual es utilizar tratamientos de ultrasonidos combinados con la adición de sustancias como surfactantes, disolventes orgánicos y/o polímeros. Existen varios trabajos que emplean polímeros como agentes dispersantes de nanotubos de carbono para la posterior modificación de electrodos empleados en electroanálisis^{25, 26}. Diferentes estudios han afirmado que los polímeros actúan rodeando o envolviendo a los nanotubos de carbono favoreciendo así su dispersión en agua^{27, 28} por presentar grupos hidrofílicos en la estructura del polímero. De esta manera y aplicando un tratamiento de ultrasonidos a los nanotubos de carbono es posible llevar a cabo su dispersión en una matriz de este tipo.

En esta Tesis se han empleado tres polímeros diferentes con el objetivo de obtener dispersiones que puedan ser utilizadas en la modificación de GCE. Los polímeros empleados son: polihistidina (PHys), polilisina (PLys), y polietilenimina ramificada (PEI), los cuales son policationes y sus estructuras se muestran en las figuras 7, 8 y 9.

Las dispersiones de MWCNT han sido preparadas siguiendo el procedimiento explicado en el Apartado III.3.1.2, en función del polímero empleado, se denominarán de ahora en adelante:

- MWCNT/PHys/(Acetato/EtOH)
- MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O)
- MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O)

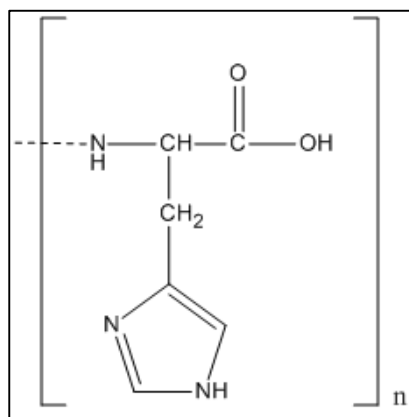


Figura 7. Estructura de la polihistidina (PHys)

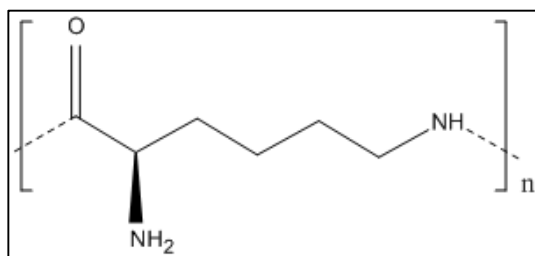


Figura 8. Estructura de la polilisina (PLys)

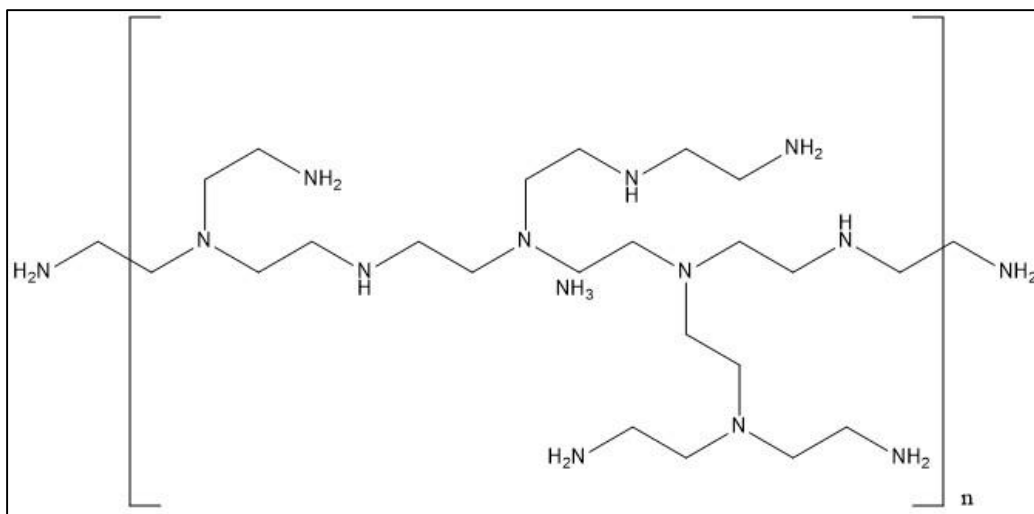


Figura 9. Estructura de la polietilenimina (PEI)

Para la preparación de la dispersión empleando la polihistidina y la polilisina como polímeros catiónicos para solubilizar los nanotubos de carbono, se han tomado como referencia los procedimientos descritos en la bibliografía^{25, 29} y se ha estudiado su modificación empleando tratamiento de ultrasonidos con sonda en lugar de baño. Cuando se preparó la dispersión con polihistidina aplicando ultrasonidos con sonda y diferentes tiempos de tratamiento (entre 1 y

10 minutos), no se consiguió dispersar los nanotubos de carbono. Se probó a variar la relación de concentraciones utilizada entre los nanotubos de carbono y el polímero, inicialmente, cuatro veces superior la concentración de nanotubos de carbono respecto a la de polímero. Se decidió estudiar concentraciones menores del nanomaterial, probando relaciones MWCNT / PHys de 2/1 y 1/1 y aplicando tratamiento de ultrasonidos con sonda durante 10 minutos. En todos los casos se obtuvieron dispersiones con grandes agregados y muy poco estables en el tiempo (inferior a cinco minutos). En ellas además los nanotubos de carbono decantan completamente al someter la dispersión a centrifugación durante un breve período de tiempo. Por ello, se ha continuado el trabajo utilizando el baño de ultrasonidos para preparar esta dispersión, descartando el uso de la sonda. Se ha comprobado la respuesta del electrodo modificado mediante la voltamperometría cíclica del ácido ascórbico de concentración 0,050 M en tampón acetato 0,050 M pH 5,00 y el resultado, comparado con la respuesta de un GCE sin modificar se muestra en la figura 10.

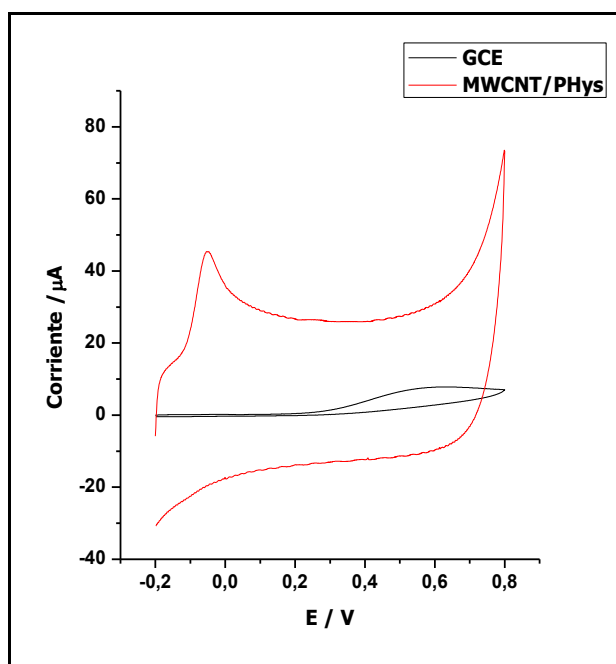


Figura 10. Voltamperometría cíclica del ácido ascórbico con un GCE (negro) y un GCE modificado con MWCNT/(Actetato/EtOH) (rojo)

En la figura 10 se observa la disminución del potencial de oxidación y el aumento de la relación entre la corriente de oxidación y la corriente capacitativa cuando se emplean nanotubos de carbono en el electrodo de trabajo. Este comportamiento es común de este nanomaterial debido a su elevada conductividad y mayor área específica con respecto a un electrodo GCE. Por tanto, se ha decidido estudiar la respuesta de esta dispersión con los compuestos polifenólicos para su posible utilización en la detección electroquímica de los mismos.

En la modificación de la preparación de la dispersión empleando polilisina el estudio se hizo de forma similar, por lo que se empezó estudiando el tiempo de tratamiento de ultrasonidos. Se probaron diferentes tiempos entre 1 y 10 minutos obteniéndose la mejor dispersión con un

tiempo de tratamiento igual a cinco minutos. Sin embargo, y debido a la baja estabilidad de la dispersión durante un breve período de tiempo, se probó a aumentar la concentración de polímero con respecto a la de nanotubos de carbono. Se probaron relaciones de concentraciones MWCNT/PLys de 1/2, 1/3 y 1/4 pero se comprobó que la variación de esta relación de concentraciones no da lugar a ninguna mejora en cuanto a la estabilidad de la dispersión durante un tiempo determinado, por lo que se decidió continuar con la relación descrita en la bibliografía de 1 mg de MWCNT en 1 mg/mL de polilisina en EtOH/agua. Las respuestas de los electrodos modificados con las dispersiones de polilisina hechas con el tratamiento con baño descrito en bibliografía²⁹ y el tratamiento con sonda de ultrasonidos durante cinco minutos, se han estudiado realizando las voltamperometrías cíclicas del ácido ascórbico de concentración 0,050 M en tampón acetato 0,050 M pH 5,00 y se muestran en la figura 11, comparadas con la respuesta de un GCE sin modificar.

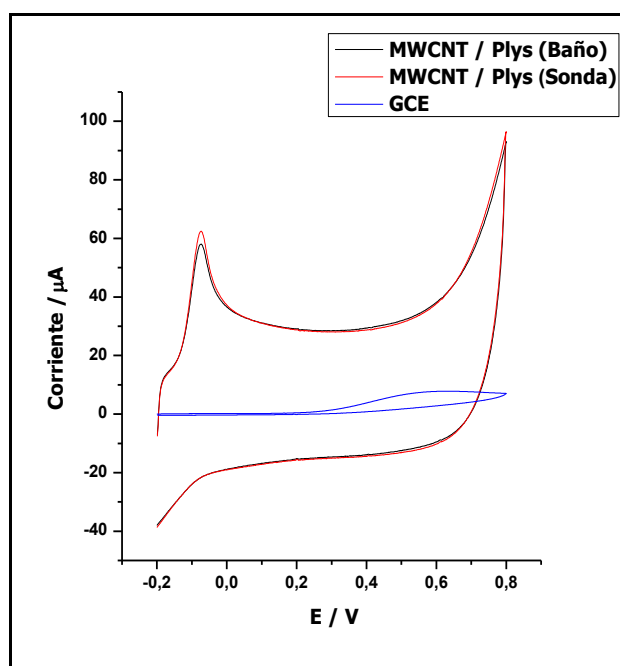


Figura 11. Voltamperometría cíclica del ácido ascórbico con los electrodos modificados de MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O) empleando tratamiento de ultrasonidos mediante baño (negro), sonda (rojo) y GCE (azul)

En la figura 11 se observa que la respuesta de los dos electrodos es la misma, con una disminución del potencial de oxidación de 0,6 V y un aumento importante de la relación entre la corriente de oxidación y la corriente capacitativa. Sin embargo, la estabilidad de la dispersión es notablemente mayor cuando la dispersión se hace empleando el baño de ultrasonidos, por lo que se ha decidido continuar con esta y descartar la preparada con sonda para estudiar su comportamiento con los compuestos polifenólicos.

Tanto para la dispersión usando polihistidina como polilisina, se ha observado que, después de aplicar durante media hora tratamiento de ultrasonidos con baño, se obtienen pequeños agregados de nanotubos de carbono. Cuando se depositan 10 μ L de dispersión sobre la superficie de GCE pulida, se observa un efecto de repulsión entre la superficie de carbono

vítreo y el nanomaterial, lo que da lugar a una acumulación de nanotubos de carbono sobre la capa de teflón que rodea al electrodo. El hecho de que los nanotubos se encuentren formando agregados y no dispersos completamente dificulta la formación de una película homogénea que cubra por completo la superficie del electrodo.

La última dispersión preparada se ha hecho empleando PEI como agente dispersante y siguiendo el método desarrollado en el grupo de investigación³⁰. Se ha empleado la sonda de ultrasonidos durante una hora, en lugar de baño de ultrasonidos 15 minutos, modificación que ya había sido estudiada previamente en el grupo. Tras la aplicación de tratamiento de ultrasonidos, y a diferencia de las dos anteriores, se obtiene una dispersión con el aspecto de una tinta negra, homogénea y sin la presencia de agregados de nanotubos de carbono. En la imagen de la figura 12 se observa el aspecto de las tres dispersiones obtenidas:



Figura 12. De izquierda a derecha, dispersión de nanotubos de carbono en MWCNT/PHys/(Acetato/EtOH), MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O)

Las tres dispersiones sobre una superficie de GCE se han observado con un microscopio y una magnificación de 210 aumentos obteniéndose las imágenes que se muestran en la figura 13.

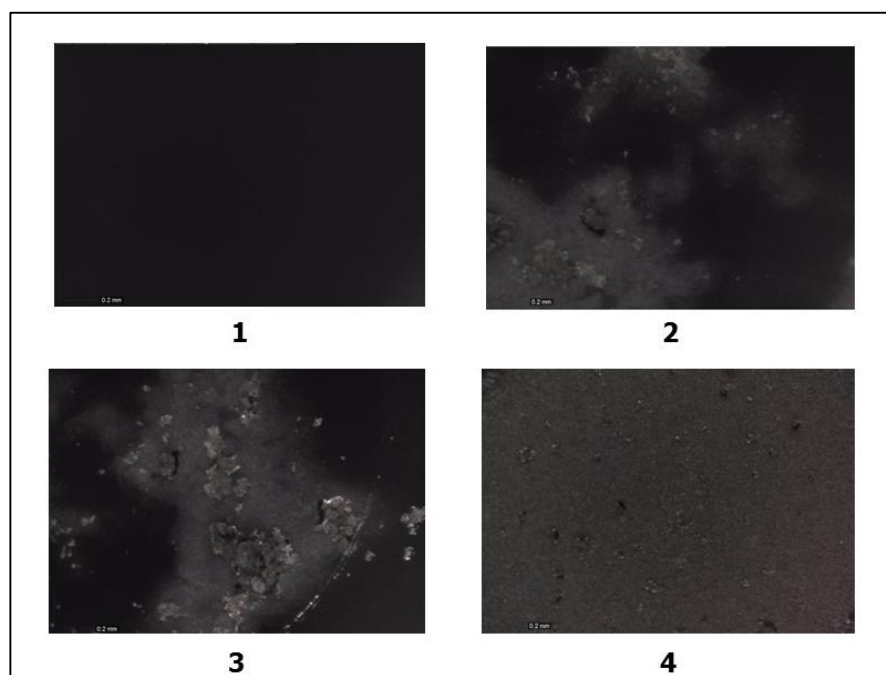


Figura 13. Imágenes observadas con un microscopio y una magnificación de 210 mm de GCE sin recubrir (1), MWCNT/PHys/(Acetato/EtOH) (2), MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O) (3) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (4)

Las fotografías de la figura 13, ponen de manifiesto que las dispersiones de nanotubos de carbono correspondientes a polihistidina (2) y polilisina (3) muestran zonas con agregados de nanotubos de carbono sobre una base oscura que lógicamente corresponde a la superficie de GCE (ver fotografía 1). Así mismo de la imagen 4, correspondiente a la dispersión en polietilenimina, se puede ver con cierta claridad la formación de una superficie homogénea que cubre de forma completa la superficie del GCE, dicha superficie se corresponde con la película finamente formada de nanotubos de carbono. A la vista de estas imágenes, no se consideró necesario realizar estudios por microscopía electrónica (TEM y SEM) para la caracterización de las dispersiones de trabajo.

IV.1.2.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO EN PRESENCIA DE POLIFENOLES

IV.1.2.2.1. Estudios voltamperométricos

La respuesta electroquímica de los electrodos modificados con cada una de las dispersiones se ha evaluado mediante voltamperometría cíclica. Estos experimentos se realizaron empleando como sondas electroquímicas tres ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico: cafeico, ferúlico y *p*-cumárico, cuyas estructuras se muestran en la figura 14:

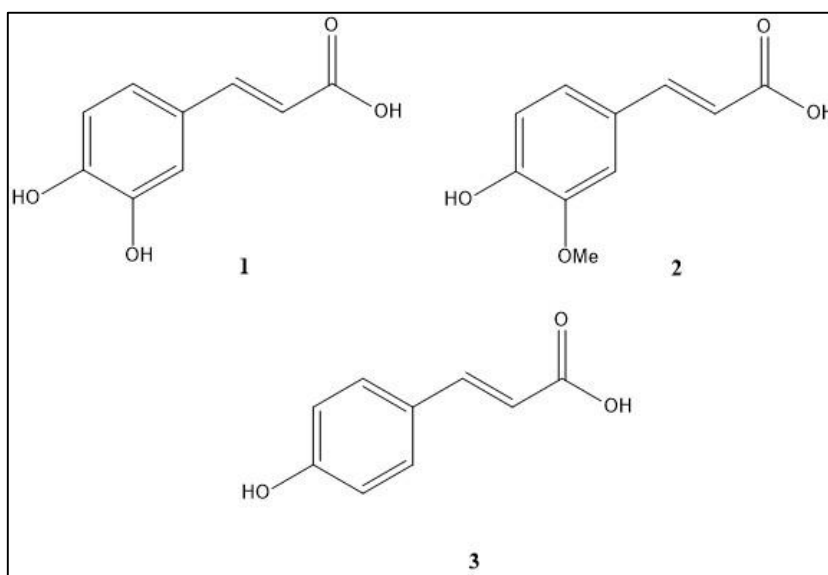


Figura 14. Estructura de los ácidos cafeico (1), ferúlico (2) y *p*-cumárico (3)

Los primeros estudios se llevaron a cabo empleado como electrolito soporte una disolución tampón de acetato en concentración 0,05 M y pH 5,00 y como electrodo de trabajo, un GCE modificado con las tres dispersiones de nanotubos de carbono a estudiar. Antes de cada experimento, se realizó el pretratamiento electroquímico del electrodo descrito en el Apartado III.3.2. Los voltamperogramas cíclicos de los ácidos fenólicos se registraron empleando disoluciones de cada analito en una concentración de $5,00 \times 10^{-5}$ M. Los resultados obtenidos se han comparado con los correspondientes a un electrodo GCE sin modificar.

En las figuras 15, 16 y 17 se muestran las respuestas obtenidas en la realización de las voltamperometrías cíclicas de los ácidos cafeico, ferúlico y *p*-cumárico respectivamente.

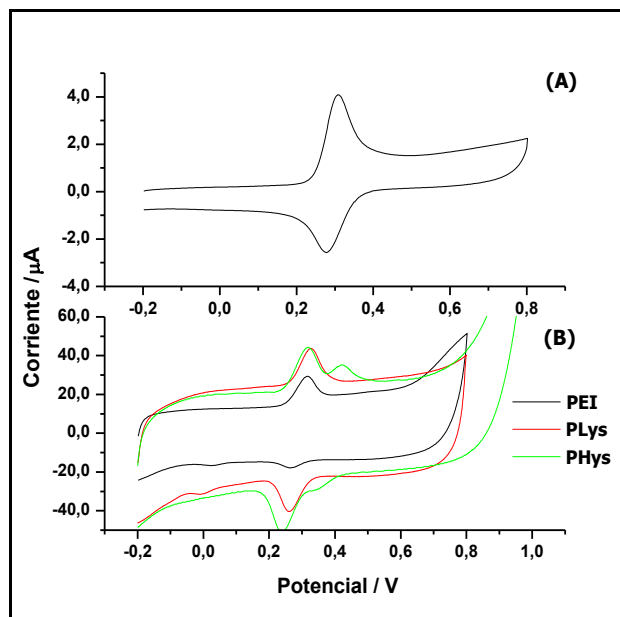


Figura 15. Respuesta electroquímica para el ácido cafeico con GCE (A) y MWCNT/PHys/(Acetato/EtOH) (verde), MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O) (rojo) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (negro) (B)

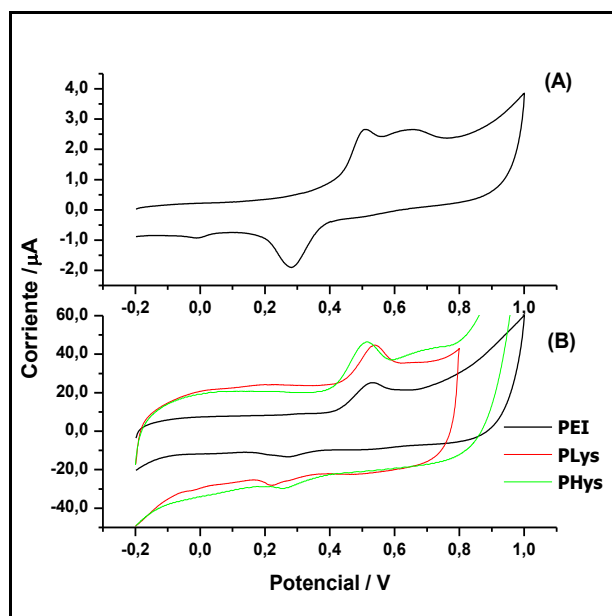


Figura 16. Respuesta electroquímica para el ácido ferúlico con GCE (A) y MWCNT/PHys/(Acetato/EtOH) (verde), MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O) (rojo) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (negro) (B)

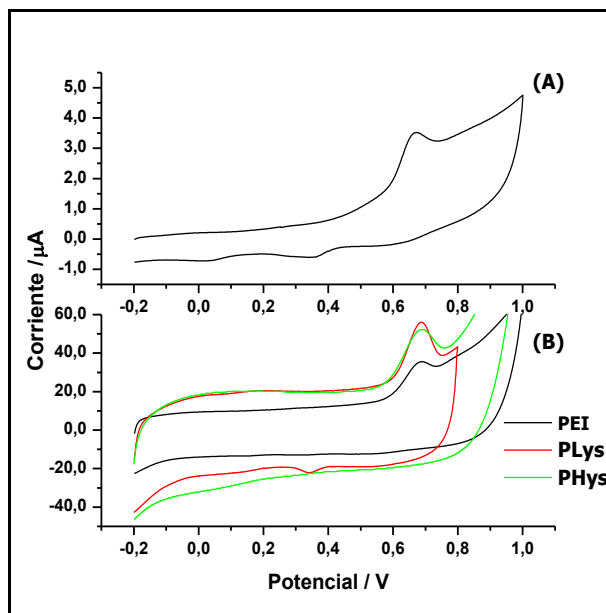


Figura 17. Respuesta electroquímica para el ácido *p*-cumárico con GCE (A) y MWCNT/PHys/(Acetato/EtOH) (verde), MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O) (rojo) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (negro) (B)

Los voltamperogramas muestran que cuando se emplean GCE modificados con nanotubos de carbono se observan mayores intensidades en los picos anódicos, correspondientes a la oxidación de los analitos, en comparación con la obtenida con un GCE sin modificar. Sin embargo también se aprecia un incremento de la corriente capacitativa en la respuesta de los electrodos modificados.

En la tabla 11, se muestran los valores de las intensidades medias y potenciales del pico anódico, con la desviación estándar de la media para tres repeticiones, de las tres especies estudiadas con los diferentes electrodos de trabajo y comparadas con el valor obtenido cuando se repite el estudio con un GCE. En la tabla 12 se muestran las corrientes capacitativas obtenidas para cada electrodo.

Tabla 11. Valores de intensidad y potencial de pico anódico del ácido cafeico para el electrodo de GCE y los tres electrodos modificados con nanotubos de carbono

Electrodo	Cafeico		Ferúlico		Cumárico	
	I / μ A	E / mV	I / μ A	E / mV	I / μ A	E / mV
GCE	2,8 \pm 0,1	314 \pm 2	1,8 \pm 0,1	506 \pm 0	1,7 \pm 0,1	689 \pm 7
PHys	19 \pm 6	319 \pm 0	21 \pm 6	514 \pm 5	31 \pm 1	691 \pm 1
PLys	24 \pm 7	326,5 \pm 0,7	20,2 \pm 0,9	541 \pm 2	29 \pm 9	686 \pm 5
PEI	16,2 \pm 0,5	316,5 \pm 0,7	16,9 \pm 0,9	548 \pm 3	17,3 \pm 0,5	682,5 \pm 0,7

Tabla 12. Valores de intensidad de corriente capacitativa para el electrodo de GCE y los tres electrodos modificados con nanotubos de carbono

Electrodo	I capacitativa / μA
GCE	$0,4 \pm 0,1$
PHys	18 ± 2
PLys	22 ± 2
PEI	11 ± 2

Los electrodos de trabajo modificados con las dispersiones de nanotubos de carbono en polihistidina y polilisina presentan respuestas parecidas, con corrientes capacitativas y poca variación en las intensidades de pico correspondientes a cada ácido fenólico. Cuando el electrodo de trabajo empleado es el modificado con dispersión de nanotubos de carbono en PEI las intensidades de corriente de los picos anódicos son inferiores con respecto a los otros dos electrodos modificados pero también lo son las corrientes capacitativas. Los potenciales de pico son ligeramente superiores cuando se emplean nanotubos de carbono en el electrodo para los ácidos cafeico y ferúlico y ligeramente inferiores para el ácido *p*-cumárico.

El aumento general de las intensidades observado al emplear electrodos modificados puede explicarse como una consecuencia del aumento en el área superficial del GCE una vez que se ha formado la capa del material nanoestructurado.

La diferencia en los resultados obtenidos dependiendo del polímero utilizado como dispersante podría ser una consecuencia de su capacidad para dispersar los nanotubos de carbono, es decir, cuánto puede aumentar la solubilidad de los mismos y evitar la formación de agregados. La presencia de estos agregados hace que en ocasiones la superficie de GCE no quede cubierta al completo ni de forma uniforme. Esto hace que el comportamiento del electrodo no sea el esperado al usar estos nanomateriales ya que la relación señal/ruido (en este caso, la relación entre la intensidad de pico y el valor de la corriente capacitativa) no aumenta tanto como se espera y la reproducibilidad de la señal no es apropiada.

En vista de los resultados obtenidos, a la hora de escoger una dispersión para la modificación de GCE debe tenerse en cuenta cuál proporciona recubrimientos de electrodos completos y uniformes ya que repercuten decisivamente en la calidad y reproducibilidad de la respuesta electroquímica, buscando que proporcionen aumentos en las intensidades de pico combinados con corrientes capacitativas razonables.

IV.1.2.2.2. Estabilidad de la señal amperométrica

Se ha estudiado la estabilidad en la respuesta amperométrica durante un tiempo determinado de los electrodos con los diferentes ácidos fenólicos. Para ello, en una celda electroquímica con electrolito soporte, se añade el ácido fenólico en una concentración de $5,00 \times 10^{-5}$ M manteniendo una agitación y potencial de trabajo constante y se mide la respuesta del electrodo (intensidad de corriente) durante 20 minutos. Los potenciales de trabajo empleados han sido 0,320 V para el ácido cafeico, 0,600 V para el ácido ferúlico y 0,700 V para el ácido

p-cumárico. Estos potenciales se seleccionaron en base a los potenciales de pico obtenidos en los experimentos voltamperométricos anteriores. Previo a este análisis, se hace el mismo pretratamiento electroquímico. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 18, 19 y 20.

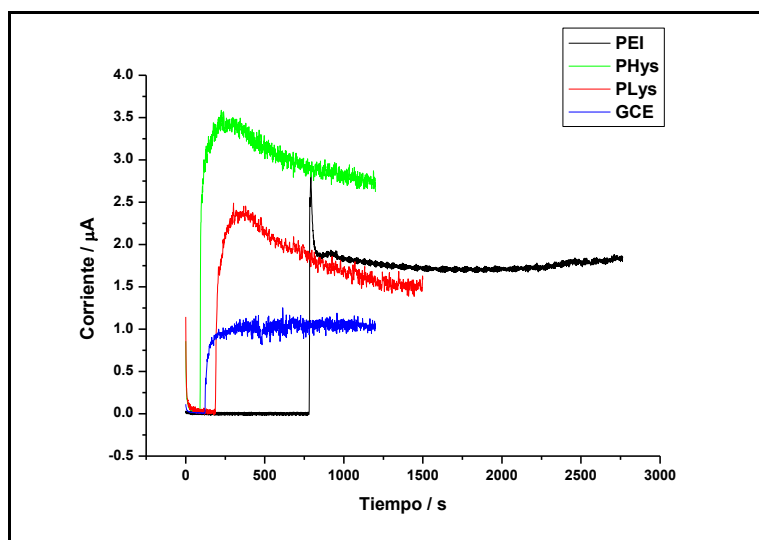


Figura 18. Estudio de la estabilidad de la respuesta amperométrica en presencia de ácido cafeico con GCE (azul), MWCNT/PHys/(Acetato/EtOH) (verde), MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O) (rojo) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (negro)

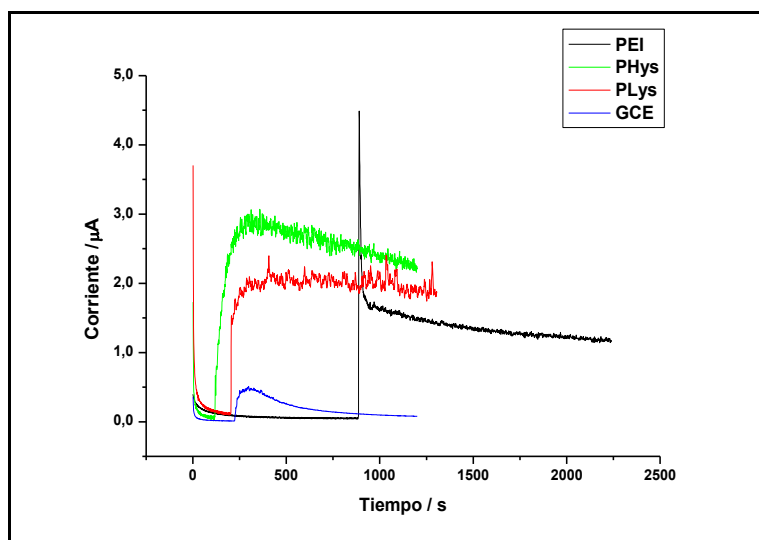


Figura 19. Estudio de la estabilidad de la respuesta amperométrica en presencia de ácido ferúlico con GCE (azul), MWCNT/PHys/(Acetato/EtOH) (verde), MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O) (rojo) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (negro)

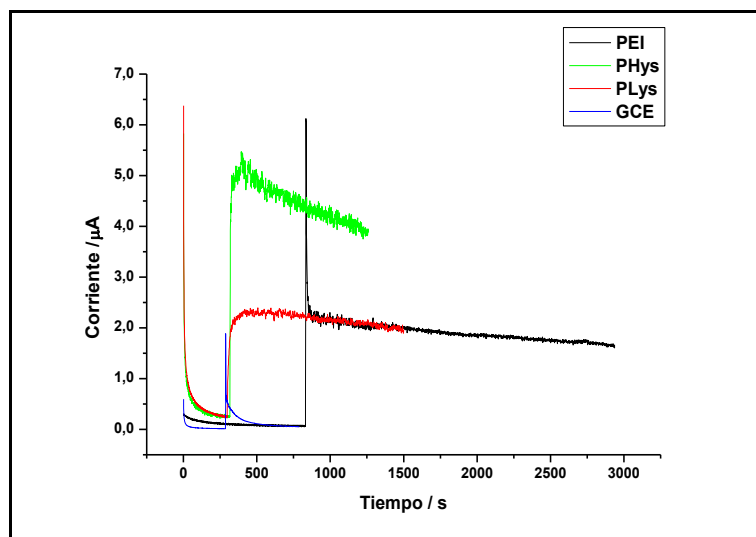


Figura 20. Estudio de la estabilidad de la respuesta amperométrica en presencia de ácido *p*-cumárico con GCE (azul), MWCNT/PHys/(Acetato/EtOH) (verde), MWCNT/PLys/(EtOH/H₂O) (rojo) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (negro)

Como se puede ver en las figuras mostradas, las señales proporcionadas por los electrodos modificados con nanotubos de carbono experimentan un aumento rápido de señal tras la adición del polifenol en la celda alcanzando una señal relativamente estable en unos 20 segundos. Este tiempo es suficiente para que la concentración del polifenol sea homogénea en la celda. Posteriormente la señal amperométrica disminuye ligeramente con el tiempo, aproximadamente un 30% (ácido cafeico) y un 20% (ácidos ferulico y *p*-cumárico) a un tiempo de 25 minutos. Cuando se compara con el GCE la señal del electrodo sin modificar disminuye notablemente cuando se adicionan los ácidos ferúlico (80%) y/o *p*-cumárico (90%).

Los compuestos de estudio en su proceso de oxidación forman productos que se adsorben sobre la superficie de un GCE formando una película que lo pasiva y que, en algunos casos como por ejemplo en el análisis de ácido *p*-cumárico, lo inutiliza en un breve período de tiempo^{31, 32}. Los electrodos modificados con nanotubos de carbono presentan una superficie activa grande que hace que los síntomas de pasivación tarden más en aparecer. Además, los nanotubos de carbono podrían favorecer la formación de productos menos agresivos con el electrodo³³⁻³⁵. Debido a esto y tal y como se refleja en las respuestas amperométricas mostradas anteriormente, el electrodo modificado es más estable en el tiempo, o lo que es lo mismo, su vida útil aumenta.

Para los tres compuestos de interés la dispersión de nanotubos de carbono en PEI dio lugar a respuestas estables en el tiempo. Esta mejora en la estabilidad puede estar relacionada con la formación de capas de nanotubos más completas y homogéneas sobre la superficie del GCE. Sin embargo es más frecuente observar recubrimientos con huecos al emplear las otras dispersiones, exponiendo parte del GCE a la disolución y, por tanto, existiendo una porción de la superficie del electrodo que se pasiva más rápidamente. Esto concuerda con el aspecto físico de las dispersiones y la falta de homogeneidad de las dispersiones obtenidas al utilizar polilisina y polihistidina.

Todos estos resultados mostrados, dieron lugar a la elección de MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) como dispersión que cumple los requisitos propuestos inicialmente para su utilización en el análisis electroquímico de compuestos polifenólicos.

IV.1.2.3. pH DE TRABAJO

La gran mayoría de procesos electródicos de compuestos orgánicos dependen del pH ya que generalmente están involucrados protones, bien porque participen en un equilibrio ácido-base o hidrólisis o bien porque intervengan en la reacción electroquímica. Debido a ello, resulta necesario estudiar la influencia del pH en el proceso electroquímico de los polifenoles. Para ello, además de los ácidos fenólicos empleados anteriormente, se ha añadido el ácido gálico con el objetivo de estudiar el comportamiento de un grupo de polifenoles diferente al que pertenecen los otros tres ácidos. El ácido gálico es un derivado del ácido benzoico que presenta tres grupos hidroxilo en su anillo aromático, tal como se muestra en la figura 21.

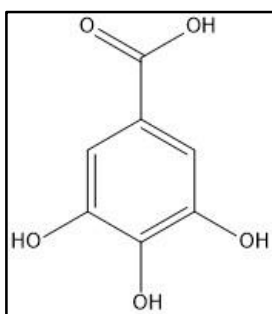


Figura 21. Estructura del ácido gálico

Estos compuestos se oxidan mediante un proceso similar a la reacción electroquímica reversible de la hidroquinona³⁶, en la cual se liberan dos protones y dos electrones, según se muestra en la figura 22, para formarse la quinona correspondiente:

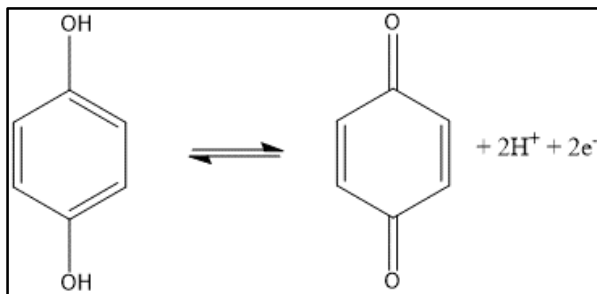


Figura 22. Oxidación electroquímica de la hidroquinona

Se ha descrito que la oxidación electroquímica del ácido cafeico es un proceso en el cual se desprenden dos protones y dos electrones³⁷ mientras que en el caso de los ácidos ferúlico y

p-cumárico se desprende un protón y un electrón³⁸. De ello se deduce que la oxidación electroquímica de estos compuestos es un proceso dependiente del pH del medio.

Para evaluar la influencia del pH en la señal electroquímica en presencia de los polifenoles, se han realizado experimentos voltamperométricos empleando GCE modificados con la dispersión MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O). Para ello se decidió utilizar una concentración $5,00 \times 10^{-4}$ M de analito, tras comprobar que se continuaba dentro del intervalo de linealidad al aumentar la concentración de trabajo, ya que se reduce la variabilidad relativa de las señales.

Se ha estudiado en primer lugar la respuesta voltamperométrica que se obtiene a pH muy ácido, ácido, neutro y básico. Para ello se han empleado como electrolito soporte las siguientes disoluciones:

- Ácido sulfúrico, 0,050 M, pH 1,00
- Disolución reguladora de acetato 0,050 M, pH 4,50
- Disolución reguladora de fosfato 0,050 M, pH 7,30
- Disolución reguladora de borato 0,050 M, pH 9,20

Los voltamperogramas cíclicos obtenidos se muestran en las figuras 23, 24, 25 y 26.

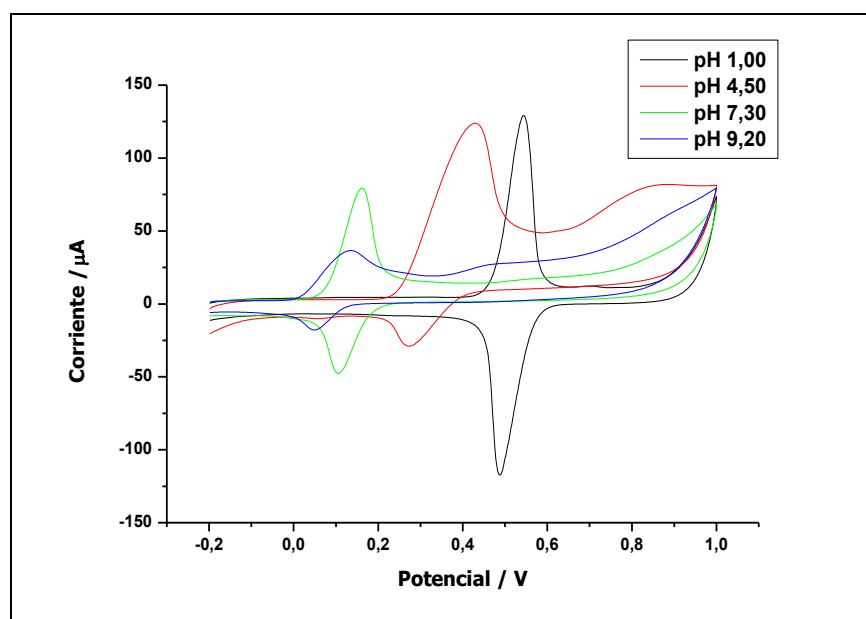


Figura 23. Voltamperometría cíclica del ácido cafeico a diferente pH de trabajo

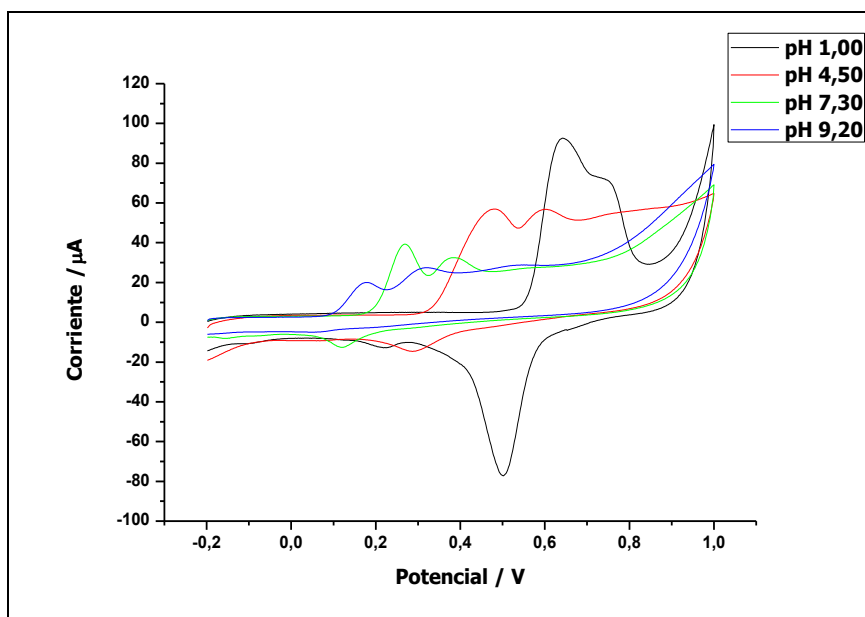


Figura 24. Voltamperometría cíclica del ácido ferúlico a diferente pH de trabajo

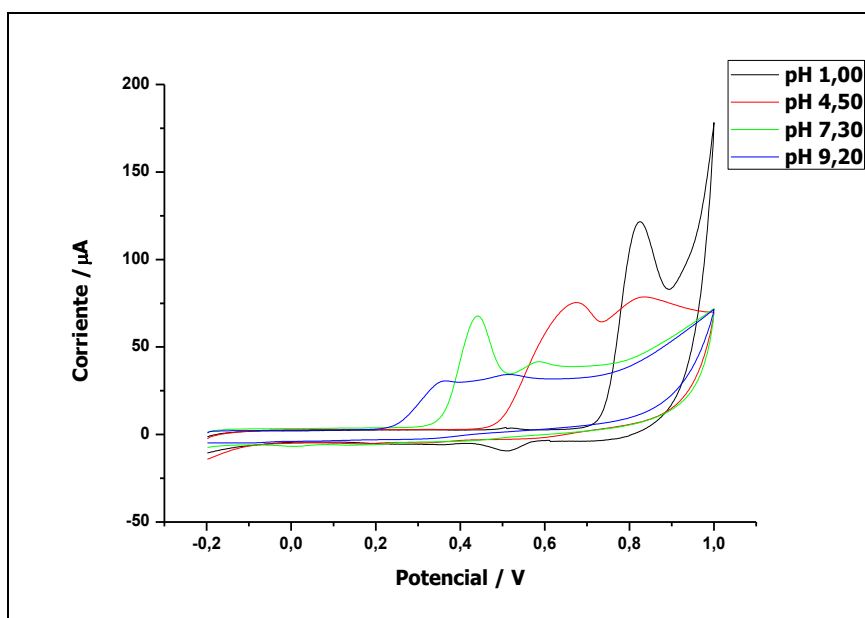


Figura 25. Voltamperometría cíclica del ácido p-cumárico a diferente pH de trabajo

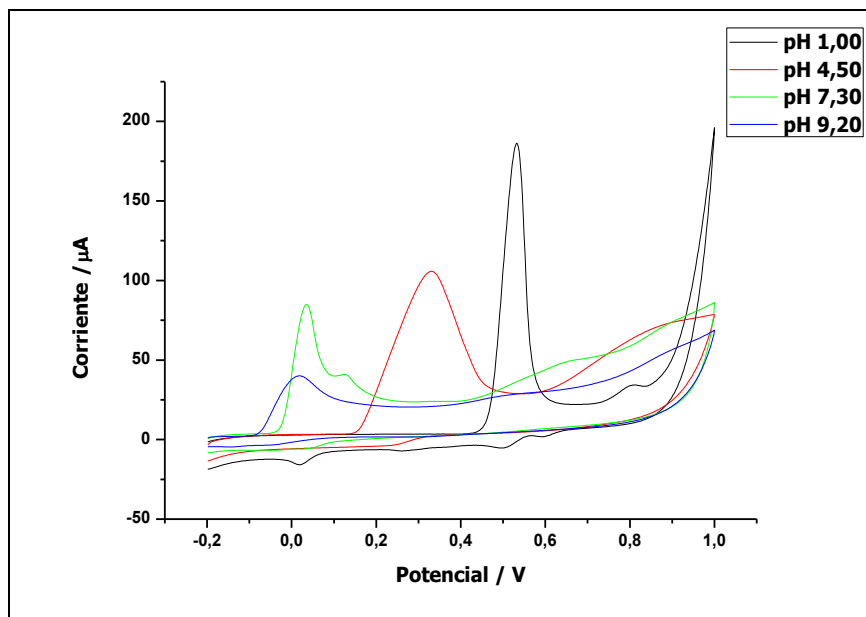


Figura 26. Voltamperometría cíclica del ácido gálico a diferente pH de trabajo

En los voltamperogramas cíclicos mostrados se observa la disminución de los potenciales de oxidación de los compuestos estudiados a medida que aumenta el pH del medio. Además las intensidades de los picos disminuyen al aumentar el pH, obteniendo generalmente las mayores intensidades a valores de pH ácidos. Esta evolución en los potenciales de pico con el pH está de acuerdo con la disminución de los potenciales esperada en procesos de oxidación electroquímica con pérdida de protones^{2, 39}. Por su parte, la disminución de las intensidades de pico es similar a la descrita en la bibliografía y está relacionada con la mayor dificultad en la oxidación de los fenolatos a pH básico^{40, 41}. Dado que a pH neutro las ondas de oxidación de ácidos gálico, ferúlico y *p*-cumárico son más anchas y distorsionadas, incluso con aparición de hombros, y que a pH muy ácido la corriente de fondo a los potenciales de oxidación de los compuestos, especialmente del ácido *p*-cumárico, es más elevada se optó por continuar los estudios a pH cercanos a 4,50.

A continuación se realizó un nuevo estudio voltamperométrico empleando disoluciones de electrolito soporte de ácido acético 0,050 M de pH comprendido entre 2,90 y 6,00. En este caso se ha empleado ácido gálico en concentración $5,00 \times 10^{-4}$ M como analito ya que la evolución de las señales voltamperométricas con el pH de los cuatro compuestos fenólicos es cualitativamente similar, como se ha mostrado previamente. Por ello se estimó que las conclusiones extraídas de estos experimentos se pueden extender al resto de compuestos.

Los voltamperogramas obtenidos en estas condiciones mostraron un perfil similar al descrito previamente (figura 26). En la figura 27 se muestra la evolución de la intensidad de pico y del potencial de pico de la onda de oxidación del ácido gálico a cada pH de trabajo.

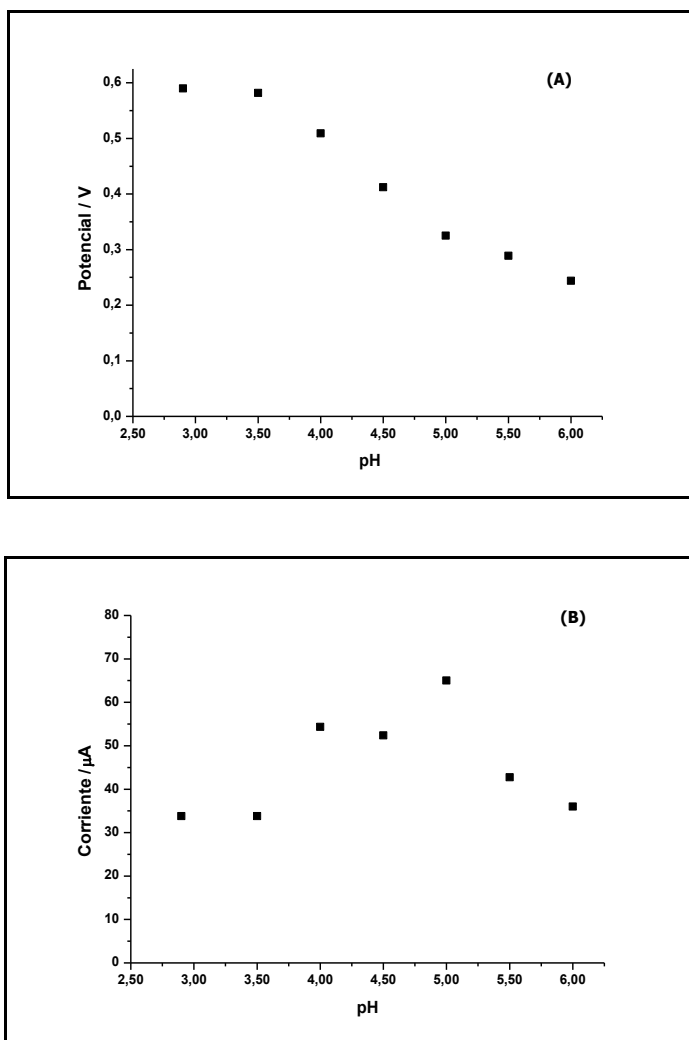


Figura 27. Representación de la variación del potencial (A) e intensidad de corriente (B) con pH de trabajo para el ácido gálico

En la figura 27 se puede apreciar que el potencial de pico disminuye al aumentar el pH. Además la intensidad de pico presenta una zona de máximo valor en el intervalo comprendido entre pH 4,00 y 5,00. En este intervalo la relación entre la intensidad de pico y la señal de fondo es máxima si bien hay un aumento de la corriente capacitativa al potencial de pico a pH menores de 4,00. Teniendo en cuenta que se pretende utilizar estos electrodos para el análisis de polifenoles en muestras de vino con el mínimo tratamiento de muestra, se decidió fijar un valor de pH de 4,50 para el resto de estudios. Este pH tiene mayor compatibilidad con el valor presentado habitualmente por estas bebidas, entre 3 y 4, manteniendo el electrolito soporte buena capacidad de tamponamiento.

IV.1.2.4. CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN TAMPÓN

Una vez determinado el pH y el tipo de disolución tampón, se ha llevado a cabo un estudio de influencia de la fuerza iónica del medio.

La fuerza iónica de una disolución está relacionada con la concentración y carga de todos los iones presentes en la misma y viene definida por la expresión que se indica en la ecuación 4.

$$I = \frac{1}{2} \sum c \cdot z^2$$

Ecuación 4. Expresión de la fuerza iónica

En donde c es la concentración de iones y z la carga.

El electrolito soporte empleado en este trabajo es una disolución tampón de acetato, en la cual todos los iones presentes en el medio presentan carga negativa o positiva pero de valor igual a la unidad. Cuando esto ocurre, el valor para la fuerza iónica es similar al de la concentración de iones, que hasta el momento ha sido 0,050 M.

Por tanto se ha estudiado la influencia en la variación de la fuerza iónica del medio en la respuesta electroquímica de los analitos. Para ello, se han empleado disoluciones tampón de concentraciones diferentes comprendidas en un intervalo entre 0,010 M y 0,20 M. Se han hecho los voltamperogramas cíclicos de los ácidos fenólicos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico y gálico. Los resultados obtenidos para todos los compuestos han sido similares por lo que, a modo de ejemplo, en la figura 28 se muestran los voltamperogramas obtenidos para el ácido cafeico.

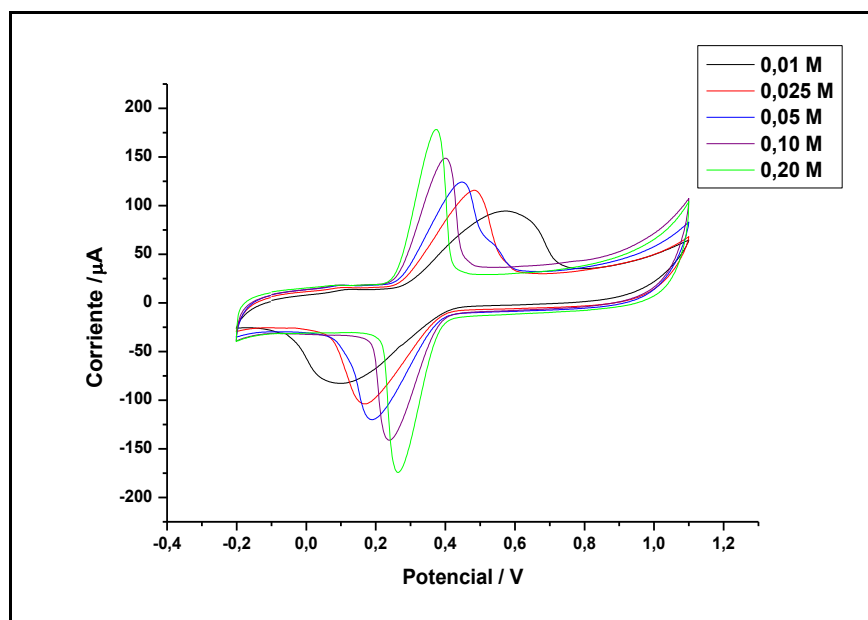


Figura 28. Respuestas voltamperométricas del ácido cafeico con diferentes concentraciones de electrolito soporte

Para una concentración inferior a la empleada inicialmente, 0,050 M, la respuesta voltamperométrica del ácido cafeico muestra ondas anchas, con potenciales de oxidación más elevados e intensidades de pico que disminuyen notablemente. Por el contrario el aumento de la concentración de acetato supone una mejora en el perfil voltamperométrico, disminuyendo los potenciales del pico de oxidación, aumentando la intensidad de los picos y reduciéndose la diferencia entre los potenciales de los picos anódico y catódico. En todos los casos los demás analitos se comportan de una forma bastante similar, con una mayor definición de las ondas de oxidación y ligera disminución de los potenciales de oxidación al incrementar la concentración del tampón.

Por lo tanto, se ha decidido continuar el trabajo con la misma disolución reguladora empleada hasta el momento.

En vista del efecto beneficioso del aumento de la fuerza iónica para la respuesta voltamperométrica obtenida con los electrodos modificados, se amplió este estudio incluyendo sales inertes en el electrolito soporte. La razón está en que, para una posterior aplicación al análisis de polifenoles en vinos, la presencia de estas sales inertes puede fijar de forma más efectiva la fuerza iónica de la matriz y compensar las posibles diferencias en el contenido de sales en la matriz real de estas muestras. Para ello, se han realizado tres ensayos, en los cuales se han añadido tres sales diferentes, cloruro sódico, cloruro potásico y nitrato sódico, a dos concentraciones distintas, 0,10 M y 0,20 M. Se han registrado los voltamperogramas cíclicos del ácido cafeico y los resultados obtenidos en sus respuestas con cada uno de los electrolitos estudiados se muestran en las figuras 29, 30 y 31. Estos resultados se han extrapolado al resto de ácidos fenólicos del estudio, por presentar los cuatro un comportamiento electroquímico similar.

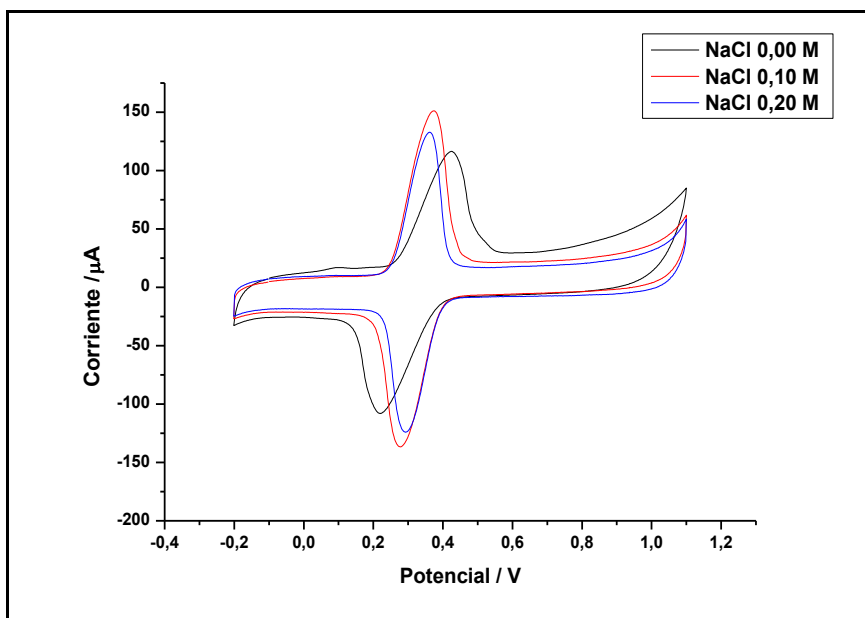


Figura 29. Respuestas voltamperométricas del ácido cafeico en presencia de NaCl en diferentes concentraciones en la disolución del electrolito soporte

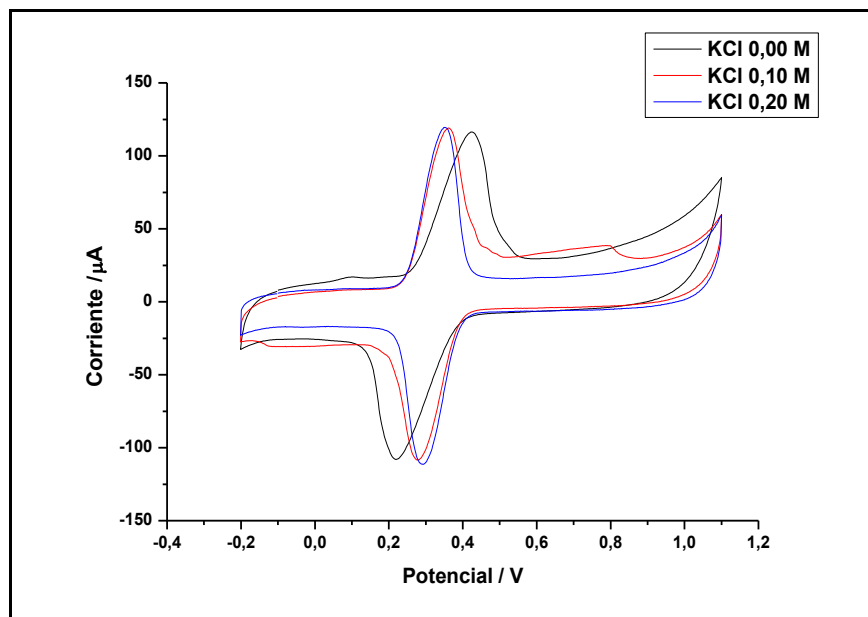


Figura 30. Respuestas voltamperométricas del ácido cafeico en presencia de KCl en diferentes concentraciones en la disolución del electrolito soporte

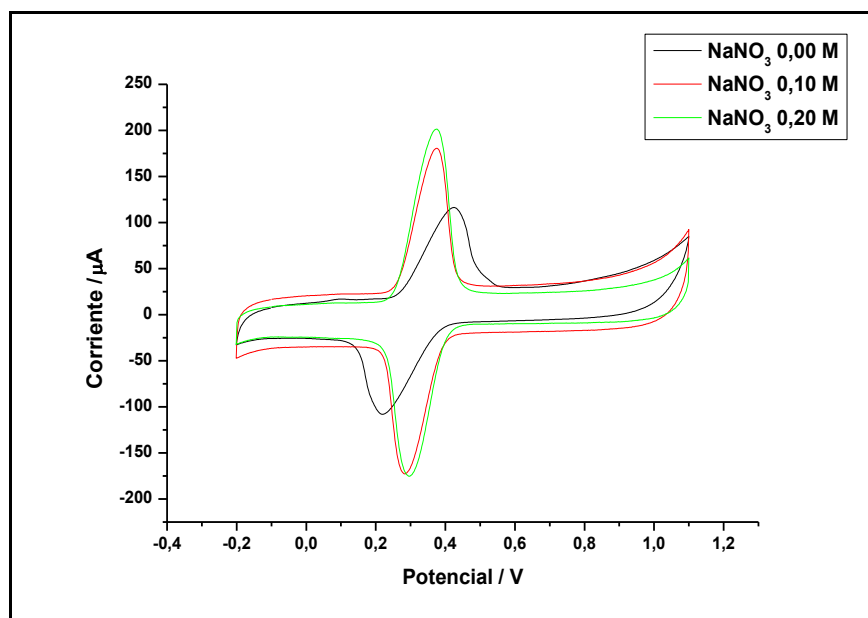


Figura 31. Respuestas voltamperométricas del ácido cafeico en presencia de NaNO_3 en diferentes concentraciones en la disolución del electrolito soporte

Al igual que en el estudio previo, en general el incremento de la concentración de electrolito soporte supone una disminución en el potencial de oxidación acompañado de un aumento en la intensidad de pico, disminuyendo también la diferencia entre potencial de pico anódico y catódico en el caso del ácido cafeico. Los beneficios observados en la respuesta

voltamperométrica al aumentar la concentración de electrolito soporte están relacionados con el aumento de la fuerza iónica en el seno de la disolución, resultando en una disminución de la resistencia interna de la celda electroquímica. Cuanto menor sea esta resistencia interna, menor será la caída óhmica entre los electrodos, minimizando así el sobrepotencial adicional necesario para vencerla y favoreciendo así que el potencial necesario para dar lugar a la reacción electroquímica sea menor. Por otra parte, la estructura porosa característica de los electrodos modificados con nanotubos de carbono también puede tener relación con este fenómeno. En la bibliografía se describe el efecto de una estructura de este tipo sobre la respuesta voltamperométrica⁴², la cual se ve afectada por el agotamiento de la sustancia electroactiva en el interior de los poros. La difusión de sustancia electroactiva hacia el interior de los poros es más difícil por lo que no puede ser reemplazada tras la electrolisis inicial, lo que trae como consecuencia un decaimiento brusco en la intensidad una vez superado el potencial de pico (efecto "thin-layer"). Análogamente se puede inferir que, a medida que el experimento voltamperométrico transcurre y la diferencia de potencial aplicada va variando, puede ser necesario que difunda más electrolito soporte hacia la superficie del electrodo para compensar el cambio asociado en la carga superficial del electrodo. Si en el interior del poro no puede llegar más electrolito soporte se generará una zona local con menor fuerza iónica, respecto a otras más accesibles, en la que será necesario que la diferencia de potencial sea mayor para producir la reacción electroquímica. Esto explicaría las mejoras en la respuesta voltamperométrica cuando la concentración de electrolito es mayor de 0,05 M (más notable al variar la concentración de tampón acetato) ya que es de esperar que la fuerza iónica en el interior de los poros no varíe tanto durante el experimento en estas condiciones.

Los resultados de este estudio dejan clara la necesidad de añadir un electrolito inerte a la disolución de electrolito soporte, optando por emplear cloruro sódico en concentración 0,10 M en experimentos posteriores.

IV.1.3. RESULTADOS: ESTUDIOS EN UN SISTEMA FIA

Una vez realizados los estudios de respuesta electroquímica de los polifenoles se ha empleado un sistema de inyección en flujo (FIA) que incluye una celda electroquímica como sistema de detección. El electrodo de trabajo que se ha usado es el GCE modificado MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O).

A partir de las respuestas electroquímicas de los estudios anteriores se ha podido determinar que los polifenoles presentan diferentes potenciales de oxidación. Así, se pueden distinguir dos grupos de compuestos antioxidantes que se han denominado fácilmente oxidables y difícilmente oxidables. Al primero pertenecen los ácidos cafeico y gálico ya que ambos presentan un potencial de oxidación que comienza en torno a los 0,300 V. En el segundo están el ferúlico y *p*-cumárico, los cuales no empiezan a oxidarse hasta potenciales más altos, cerca de 0,500 V. De esta forma, el electrodo de trabajo, puede distinguir entre fracciones diferentes de polifenoles, o bien puede medir la señal correspondiente a polifenoles totales, dependiendo del potencial de trabajo elegido. Así se obtienen los índices electroquímicos, definidos por las respuestas de los analitos a los diferentes potenciales de trabajo.

Para la optimización del método se han estudiado los parámetros más influyentes en este tipo de técnica: las condiciones de flujo de electrolito portador y potencial de trabajo, realizando un estudio hidrodinámico para este último. Una vez elegidas las condiciones que más se ajustan a los requisitos deseados para aplicar el método al análisis de compuestos fenólicos en vinos blancos, se han estudiado las características analíticas y se han comparado todos los resultados obtenidos con los de un electrodo de GCE.

IV.1.3.1. ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DEL FLUJO DE TRABAJO

Uno de los parámetros más importantes en una técnica de flujo es la velocidad del flujo de trabajo, por lo que se ha estudiado su influencia en la señal obtenida a un potencial de trabajo determinado. Este potencial se ha fijado en 0,700 V, valor al cual todos los compuestos estudiados se oxidan electroquímicamente. Se han inyectado por separado los ácidos cafeico y gálico en concentración $2,50 \times 10^{-5}$ M, preparados por dilución de la disolución concentrada de los mismos en la disolución reguladora de acetato 0,05 M y pH 4,50 con NaCl 0,10 M. Se ha variado la velocidad de flujo entre 0,50 mL·min⁻¹ y 4,00 mL·min⁻¹ y los resultados obtenidos comparados con los del GCE, se muestran en la figura 32 para el ácido cafeico. Dichos resultados son similares a los que se han obtenido en el estudio del ácido gálico.

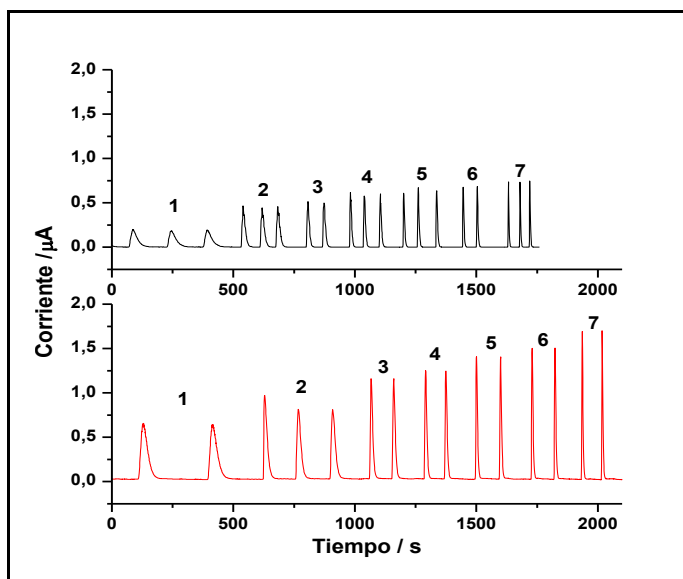


Figura 32. Señales para el ácido cafeico con los electrodos de trabajo GCE (negro) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (rojo), empleando diferentes velocidades de flujo: 0,50 mL·min⁻¹ (1), 1,00 mL·min⁻¹ (2), 1,50 mL·min⁻¹ (3), 2,00 mL·min⁻¹ (4), 2,50 mL·min⁻¹ (5), 3,00 mL·min⁻¹ (6) y 4,00 mL·min⁻¹ (7)

En la figura mostrada se observa que la intensidad de corriente aumenta y la anchura de pico disminuye a medida que la velocidad de flujo de trabajo se hace mayor. También se puede observar que este aumento de la intensidad se aprecia notablemente a velocidades más bajas y tiende a estabilizarse cuando el flujo supera una velocidad de 2,50 mL·min⁻¹, tal como se observa en la figura 33.

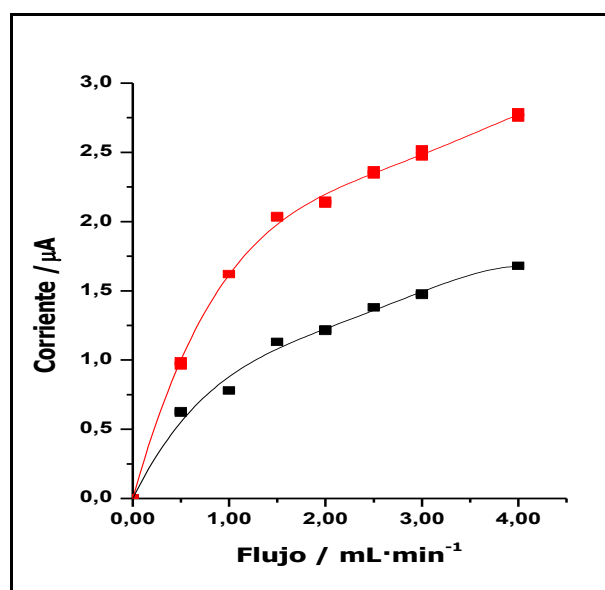


Figura 33. Intensidades de corrientes obtenidas a diferentes velocidades de flujo de electrolito portador para los ácidos cafeico (negro) y gálico (rojo) con el electrodo MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O)

Los resultados obtenidos para los ácidos cafeico y gálico se han extrapolado a los otros dos compuestos de interés por presentar comportamientos similares. Se ha elegido una velocidad de flujo de trabajo de $2,50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ por varias razones:

- Velocidades de flujo mayores no implican un aumento de intensidad de corriente significativo.
- Existe riesgo de que se produzcan pérdidas de la capa de nanotubos que modifica el electrodo si dichas velocidades son demasiado elevadas
- Se evita el excesivo consumo de disolvente trabajando a flujos más bajos.

IV.1.3.2. ESTUDIO DEL POTENCIAL DE TRABAJO

Para el estudio del potencial de trabajo en una técnica de este tipo, se utiliza un voltamperograma hidrodinámico. Para su elaboración se registra la señal de intensidad de corriente obtenida con cada potencial de oxidación en un intervalo de trabajo determinado (en este caso entre 0,00 y 1,00 V), en régimen hidrodinámico. Cada uno de los compuestos, en concentración $2,50 \times 10^{-5} \text{ M}$, se ha estudiado por separado, empleando la disolución reguladora de acetato 0,050 M a pH 4,50 con NaCl 0,10 M como electrolito portador a velocidad de flujo de $2,50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. El mismo estudio se ha realizado con el electrodo de trabajo modificado y el electrodo de GCE y los voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos se muestran en la figura 34.

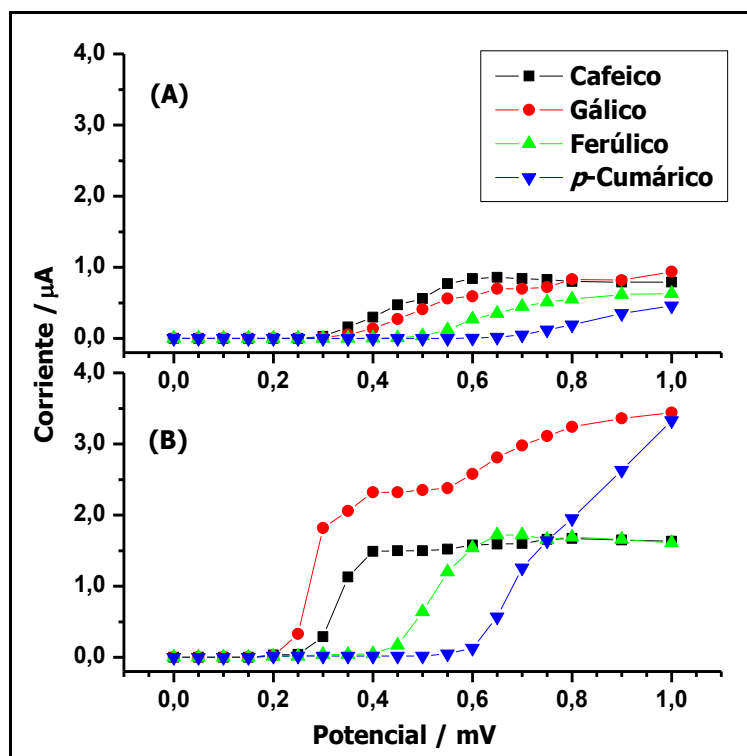


Figura 34. Voltamperograma hidrodinámico con electrodo GCE (A) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (B) como electrodos de trabajo

Los voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos con el electrodo modificado con nanotubos de carbono han mostrado la disminución del potencial de oxidación de todos los compuestos fenólicos, respecto a los obtenidos con GCE. Cuando se emplean nanotubos de carbono, la oxidación de cafeico y gálico empieza a unos 0,300 V aproximadamente y se alcanza un máximo de señal cuando todavía no han empezado a oxidarse ferúlico y *p*-cumárico, algo que no ocurre con el GCE. Como consecuencia del aumento de la diferencia en los valores de potencial necesario para la oxidación electroquímica de los compuestos, es posible la detección selectiva de los ácidos caféico y gálico empleando el electrodo de trabajo modificado con nanotubos de carbono. De esta manera es posible definir dos grupos de compuestos fenólicos: fácil y difícilmente oxidables, los cuales pueden ser detectados utilizando el electrodo modificado empleando dos potenciales de trabajo que se corresponden con las dos fracciones definidas:

- **0,300 V:** con este potencial se obtiene una señal electroquímica que se relaciona con la concentración de los compuestos fácilmente oxidables, representados en este estudio por los ácidos cafeico y gálico.
- **0,700 V:** se obtiene una señal electroquímica que se relaciona con la suma de los compuestos fácilmente oxidables y los que necesitan potenciales mayores de oxidación. Representado por los cuatro ácidos fenólicos estudiados en esta parte de la Tesis.

Por esto, se ha continuado con el estudio de las características analíticas del método empleando los dos potenciales de trabajo definidos.

IV.1.3.3. ESTABILIDAD DEL ELECTRODO

Además de la selectividad, otra ventaja del empleo de electrodos modificados con nanotubos de carbono es el aumento de la estabilidad, lo cual deriva en un aumento de su vida útil. Ya se ha explicado que los productos de oxidación de los compuestos fenólicos de estudio en esta Tesis forman una capa en la superficie del electrodo que produce la contaminación de la misma, lo cual se traduce en una disminución notable de la señal producida. Así, un GCE sin modificar sólo proporciona respuestas útiles para el análisis de este tipo de compuestos en muestras reales si su superficie ha sido recién pulida y/o regenerada, siendo su respuesta poco estable habitualmente. Esto hace que los GCE necesiten una regeneración de su superficie excesivamente frecuente, aumentando notablemente el tiempo de trabajo y haciendo más difícil obtener una buena reproducibilidad. Tal y como ya se ha descrito al principio de este apartado, las superficies basadas en nanotubos de carbono presentan una mayor área superficial activa y una mejora en la respuesta electroquímica que retrasan la acumulación del producto de oxidación del compuesto sobre la misma, lo cual hace que el electrodo se pueda utilizar para un número notablemente más elevado de medidas.

Para comprobar estos efectos se ha evaluado la estabilidad de la respuesta electroquímica de los electrodos modificados ante inyecciones de disoluciones patrón y muestras reales de vino. Para ello se ha registrado la señal amperométrica obtenida en la inyección sucesiva tanto de los cuatro ácidos fenólicos de estudio por separado, cada uno en una concentración de

$2,50 \times 10^{-5}$ M, como muestras de vino blanco y tinto, diluidos en electrolito portador 1:10 y 1:100 respectivamente, dilución habitualmente empleada en análisis de vino. El potencial de trabajo empleado ha sido 0,700 V, potencial al cual todos los compuestos que se estudian son detectables. Los dos estudios se han realizado con los electrodos GCE y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O), y los resultados obtenidos para disoluciones patrón y muestras de vino se muestran en las figuras 35, 36 y 37:

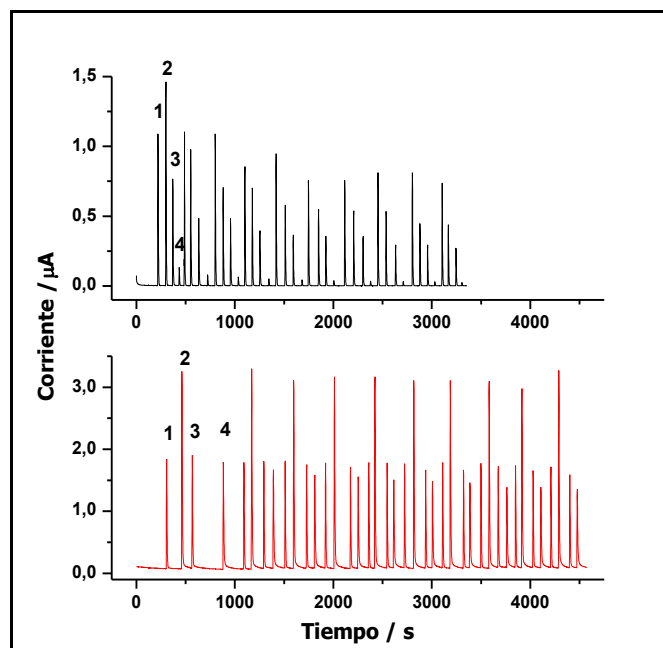


Figura 35. Respuestas amperométricas de los ácidos fenólicos cafeico (1), gálico (2), ferúlico (3) y p-cumárico (4), para los electrodos GCE (negro) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (rojo)

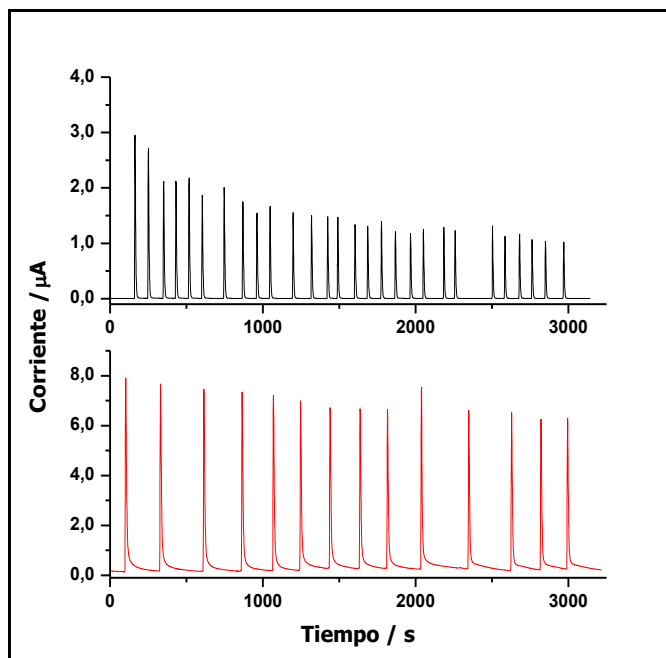


Figura 36. Respuestas amperométricas de una muestra de vino blanco diluido 1:10 en disolución reguladora de trabajo, para los electrodos GCE (negro) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (rojo)

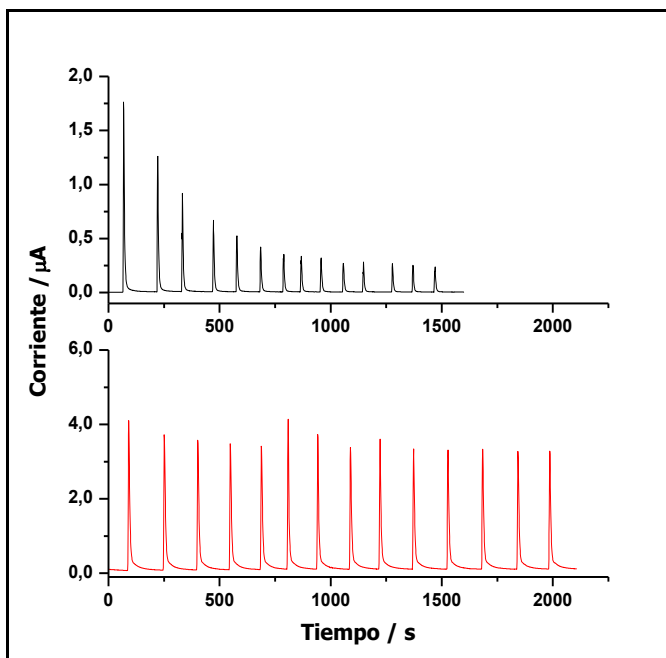


Figura 37. Respuestas amperométricas de una muestra de vino tinto diluido 1:100 en disolución reguladora de trabajo, para los electrodos GCE (negro) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (rojo)

La señal amperométrica disminuye mucho al realizar inyecciones sucesivas de disoluciones patrón y de muestras de vino cuando se emplea GCE. En el caso de las disoluciones patrón, el porcentaje de descenso de la señal es del 34%, 70%, 65% y 75% para los ácidos cafeico,

gálico, ferúlico y *p*-cumárico respectivamente con el electrodo GCE frente al 8%, 2%, 17% y 22% que se obtiene para los mismos compuestos cuando se trabaja con el electrodo modificado con nanotubos de carbono. Para las muestras reales, la pérdida de señal es más notable en el vino tinto que en el blanco, con una pérdida de señal correspondiente del 64% en el vino blanco y del 87% en el vino tinto con el electrodo GCE. Por el contrario, cuando se trabaja con el electrodo modificado con nanotubos de carbono, el porcentaje de pérdida disminuye a un 21% para los dos tipos de vino, aumentando por tanto la estabilidad.

Se ha repetido el estudio forzando un posible envenenamiento de la superficie del electrodo realizando veinte inyecciones consecutivas de ácido *p*-cumárico, compuesto para el cual el porcentaje de pérdida de la intensidad de corriente con los dos electrodos es mayor, con un potencial de trabajo de 0,800 V, y se ha comprobado la estabilidad de la señal de los otros tres compuestos después de dichas inyecciones. En la figura 38, se muestra que la estabilidad en la señal empleando el electrodo modificado se mantiene incluso después de este envenenamiento, ya que no se aprecia pérdida de la misma para los ácidos cafeico y ferúlico tras las veinte inyecciones de ácido *p*-cumárico y se observa una disminución de intensidad de corriente del 15% y 7% para los ácidos gálico y *p*-cumárico respectivamente.

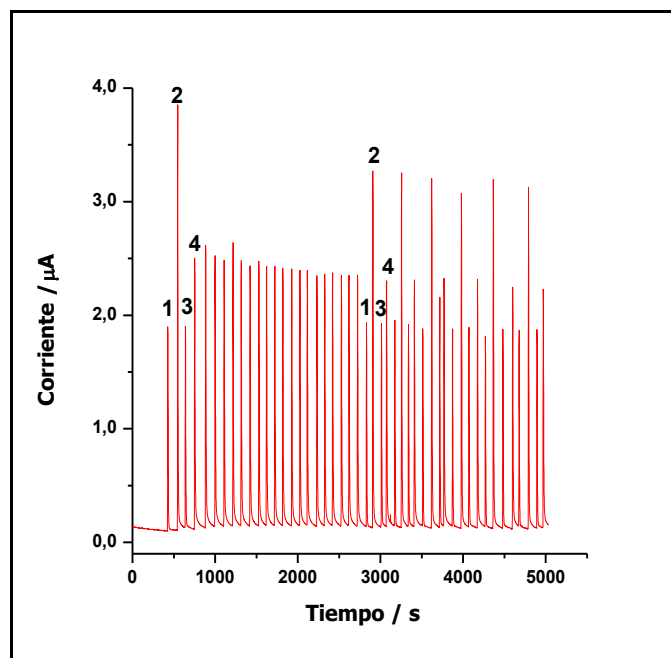


Figura 38. Respuestas amperométricas obtenidas para los ácidos cafeico (1), gálico (2), ferúlico (3) y *p*-cumárico (4), antes y después de 20 inyecciones de ácido *p*-cumárico (4) con un MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O)

Sin embargo, el mismo estudio se ha hecho también con un GCE y el resultado se muestra en la figura 39.

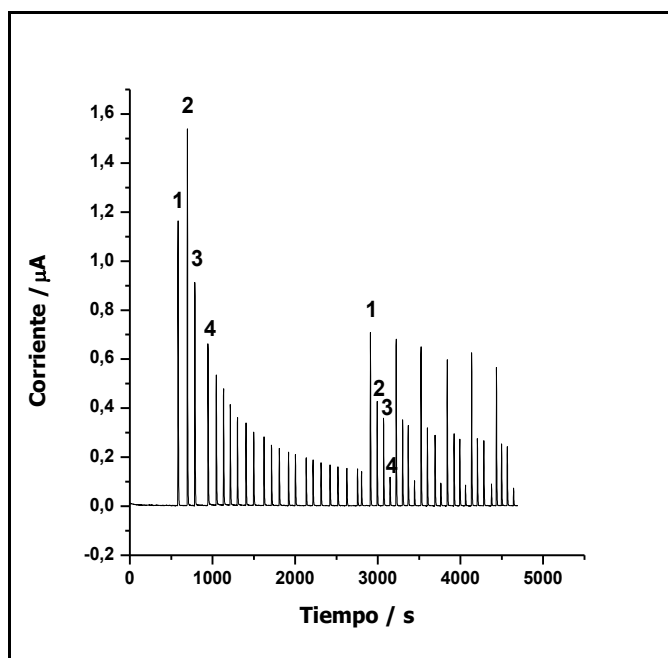


Figura 39. Respuestas amperométricas obtenidas para los ácidos cafeico (1), gálico (2), ferúlico (3) y *p*-cumárico (4), antes y después de 20 inyecciones de ácido *p*-cumárico (4) con un GCE

En la figura se refleja la disminución en la intensidad de la corriente, con un porcentaje de pérdida de señal tras las veinte inyecciones de ácido *p*-cumárico del 38%, 72%, 60% y 81% para los ácidos cafeico, gálico, ferúlico y *p*-cumárico respectivamente, debido a la posible contaminación de la superficie del electrodo.

IV.1.3.4. ESTUDIOS DE CONCENTRACIÓN DE ANALITO: INTERVALO LINEAL, LÍMITES DE DETECCIÓN (LD) Y CUANTIFICACIÓN (LC)

Para el estudio del intervalo lineal, se han utilizado disoluciones de diferentes concentraciones, entre $0,10 \times 10^{-6}$ M y $1,0 \times 10^{-4}$ M y se ha realizado para el GCE y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) con el objetivo de comparar los resultados y observar las ventajas de trabajar con materiales nanoestructurados. Los estudios se han hecho para los cuatro ácidos fenólicos: se han utilizado dos potenciales de trabajo (0,300 V y 0,700V) para los ácidos cafeico y gálico y un solo potencial (0,700 V) para los ácidos ferúlico y *p*-cumárico.

En la tabla 13 se muestra un resumen de los parámetros de calibración para los compuestos con los dos electrodos de trabajo, obtenidos mediante ajuste por mínimos cuadrados. En ella se muestran los valores para la ordenada en el origen de la ecuación de la recta obtenida y la sensibilidad del método dada por la pendiente de dicha ecuación con el error estándar de la media. En la tabla también se muestra el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson (r^2) y el intervalo lineal (IL) obtenido para cada electrodo y cada compuesto. Los valores de señal para cada concentración corresponden a la media de tres inyecciones.

Tabla 13. Parámetros de calibración para los ácidos fenólicos con los electrodos de trabajo y los potenciales de trabajo respectivos

Potencial	Compuesto	Electrodo	Ordenada / μA	Pendiente / $\mu\text{A}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$	r^2	IL / μM
0,300 V	Cafeico	GCE	$0,003 \pm 0,002$	$0,0038 \pm 0,0002$	0,990	0,3-20
		MWCNT	$0,02 \pm 0,01$	$0,0238 \pm 0,0003$	0,998	0,3-100
	Gálico	GCE	$0,0004 \pm 0,0005$	$0,0038 \pm 0,0006$	0,998	0,3-20
		MWCNT	$0,05 \pm 0,03$	$0,071 \pm 0,002$	0,995	0,1-100
0,700 V	Cafeico	GCE	$0,03 \pm 0,01$	$0,0450 \pm 0,0008$	0,997	0,1-50
		MWCNT	$0,03 \pm 0,01$	$0,0743 \pm 0,003$	0,999	0,1-100
	Gálico	GCE	$0,01 \pm 0,01$	$0,077 \pm 0,002$	0,997	0,07-20
		MWCNT	$0,05 \pm 0,05$	$0,125 \pm 0,001$	0,999	0,07-100
	Ferúlico	GCE	$0,009 \pm 0,003$	$0,0196 \pm 0,0007$	0,993	0,2-20
		MWCNT	$0,05 \pm 0,06$	$0,081 \pm 0,003$	0,990	0,1-100
	<i>p</i> -Cumárico	GCE	$0,006 \pm 0,005$	$0,0050 \pm 0,0002$	0,990	0,8-50
		MWCNT	$0,09 \pm 0,06$	$0,045 \pm 0,001$	0,993	0,2-100

De este estudio, se pueden concluir dos ventajas de trabajar con nanotubos de carbono con respecto a una superficie de trabajo de carbón vítreo: el aumento de la sensibilidad y del intervalo lineal.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para el electrodo modificado disminuyen con respecto al GCE. Para la determinación de ambos se han realizado una serie de medidas de la señal de fondo (seis medidas) y se han calculado empleando la desviación estándar de la señal de fondo y la sensibilidad (m) mediante las expresiones descritas por la IUPAC⁴².

En la tabla 14 se muestran los datos para los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para cada uno de los analitos estudiados, con los dos electrodos de trabajo y a los potenciales correspondientes.

Tabla 14. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) obtenidos para los ácidos fenólicos

Potencial	Electrodo	Cafeico	Gálico	Ferúlico	<i>p</i> -Cumárico
0,300 V	GCE	LD = 0,1 μM LC = 0,3 μM	LD = 0,1 μM LC = 0,3 μM		
	MWCNT	LD = 0,09 μM LC = 0,3 μM	LD = 0,03 μM LC = 0,1 μM		
0,700 V	GCE	LD = 0,03 μM LC = 0,1 μM	LD = 0,02 μM LC = 0,07 μM	LD = 0,06 μM LC = 0,2 μM	LD = 0,2 μM LC = 0,8 μM
	MWCNT	LD = 0,03 μM LC = 0,1 μM	LD = 0,02 μM LC = 0,07 μM	LD = 0,04 μM LC = 0,1 μM	LD = 0,07 μM LC = 0,2 μM

IV.1.3.5. ESTUDIOS DE EXACTITUD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

La exactitud se ha estudiado con la recuperación analítica. Este método consiste en añadir una concentración conocida del analito de interés a una muestra real y analizar la muestra en ausencia y presencia del analito adicionado. Las señales obtenidas en ambos casos se restan y la diferencia debe corresponder a la concentración añadida de sustancia (situación ideal) o un valor cercano. Así, se considera una buena exactitud cuando el porcentaje de concentración de analito "recuperado" se encuentra cercano al 100%. Para llevar a cabo el estudio de la exactitud, se han medido muestras de vino tinto y blanco sin dopar y dopadas con una concentración de $2,50 \times 10^{-5}$ M de ácido gálico a los potenciales de trabajo correspondientes a 0,300 V y 0,700 V. Las muestras de vino se han diluido, 1:10 en el caso de los vinos blancos y 1:100 en los tintos, en disolución tampón (electrolito portador).

Los estudios de reproducibilidad se han realizado para un mismo electrodo y para electrodos diferentes. En el primero se ha registrado la respuesta de diez inyecciones sucesivas de cada ácido fenólico en concentración $2,50 \times 10^{-5}$ M. Para el segundo, se ha medido la respuesta de cada compuesto a la misma concentración indicada empleando cuatro electrodos diferentes, realizando tres inyecciones sucesivas de analito para cada electrodo. Los dos estudios se han realizado a un potencial de trabajo de 0,700 V. La reproducibilidad de un método se expresa en porcentaje de desviación estándar (%RSD) relativa y se considera que un método es reproducible cuando el valor de dicha RSD para un número determinado de señales del mismo analito no supera el valor calculado para una concentración determinada del coeficiente de variación de Horwitz⁴³, calculado como se muestra en la ecuación 5:

$$(\%CV) = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

Ecuación 5. Coeficiente de variación de Horwitz

Los resultados de exactitud del método y reproducibilidad con el mismo electrodo e inter-electrodo, se resumen en las tablas 15 (exactitud expresada en porcentaje de recuperación analítica) y 16 (reproducibilidad expresada en %RSD).

Tabla 15. Exactitud del método expresada en porcentaje de recuperación analítica de ácido gálico

Muestra	0,300 V	0,700 V
Vino blanco	93%	83%
Vino tinto	82%	95%

Tabla 16. Reproducibilidad expresada en porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD)

Ácido Fenólico	%RSD Mismo electrodo	%RSD Inter-electrodo	%CV Horwitz
Cafeico	2,8	10,8	12,7
Gálico	2,5	11,0	12,9
Ferúlico	5,3	10,2	12,6
p-Cumárico	6,1	13,5	12,9

Los resultados obtenidos mostraron una buena exactitud del método, con porcentajes de recuperación del ácido gálico superiores al 80% y cercanos al 100% para vinos tintos y blancos, así como una buena reproducibilidad, con valores de %RSD inferiores al %CV de Horwitz para las señales con el mismo electrodo y para las señales obtenidas empleando diferentes electrodos modificados.

IV.1.3.6. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

El vino es una muestra con un alto contenido en sustancias orgánicas y sales minerales que pueden producir interferencias en el análisis electroquímico de los compuestos antioxidantes. Especialmente presenta un contenido elevado en sulfitos. Estos sulfitos actúan como agentes antimicrobianos y se añaden al vino para evitar la oxidación de los compuestos presentes en él, retardando así su deterioro.

Para el estudio de interferencias de la matriz se ha preparado una muestra de vino sintético tal y como se ha explicado en Apartado III.2.3. Dicha muestra se ha medido empleando las mismas condiciones de electrolito portador de las muestras reales y a un potencial igual a 0,700 V sin obtener señal amperométrica.

Se ha estudiado el efecto de la dilución de la muestra de vino en la señal, para lo que se han analizado diferentes diluciones en el intervalo entre 1:50 y 1:5 para el vino blanco y entre 1:250 y 1:50 para el vino tinto. Para ambas muestras, se ha obtenido una señal proporcional al factor de dilución con los dos potenciales de trabajo. Se ha decidido elegir las diluciones 1:10 y 1:100 para vino blanco y tinto respectivamente para la aplicación del método, puesto que ambas proporcionan una señal suficientemente elevada y dentro del intervalo lineal.

Para el estudio de la posible contribución de sulfitos se han realizado las medidas de una muestra de sulfito sódico (Na_2SO_3) de concentración $0,017 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en disolución tampón, concentración comúnmente encontrada en un vino blanco, a los dos potenciales de trabajo empleados, 0,300 V y 0,700 V. Los resultados han mostrado un incremento de la señal de un 4,4% a potencial 0,700 V y ningún aumento a 0,300 V.

Con estos estudios se ha demostrado la ausencia de interferencias en la señal del electrodo modificado con MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) cuando se utiliza para la detección de compuestos polifenólicos presentes en muestras de vino tinto y blanco.

IV.1.3.7. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN VINOS TINTOS Y BLANCOS

El método desarrollado se ha aplicado a la determinación de compuestos polifenólicos presentes en muestras de vino blanco y tinto. En la tabla 7 del Apartado III.2.2 se recoge la relación de muestras de vino tinto y blanco analizadas. Los vinos pertenecen a diferentes denominaciones de origen de España y diferentes tipos de uva. La cuantificación de compuestos polifenólicos en vinos se ha realizado tomando como referencia el ácido gálico y

los datos mostrados en la tabla 17 expresan, en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, la media de los equivalentes de este compuesto determinados en cada muestra junto con la desviación estándar, correspondientes a tres repeticiones para cada muestra en todos los casos.

Tabla 17. Valores medios y desviación estándar de compuestos antioxidantes para vinos tintos y blancos expresados en equivalentes de ácido gálico ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

Vino tinto	0,300 V	0,700 V
Izadi 1	263 ± 6	620 ± 41
Izadi 2	232 ± 3	592 ± 21
Izadi 3	203 ± 3	576 ± 1
Izadi 4	241 ± 1	610 ± 22
Heredad de Torresano 1	124 ± 1	453 ± 30
Heredad de Torresano 2	119 ± 1	466 ± 1
Heredad de Torresano 3	129 ± 4	458 ± 84
Alcorta 1	141 ± 3	484 ± 3
Alcorta 2	155 ± 3	512 ± 3
Alcorta 3	131 ± 1	467 ± 1
Alcorta 4	176 ± 6	580 ± 8
Pueblo Viejo 1	106 ± 1	404 ± 4
Pueblo Viejo 2	155 ± 8	514 ± 2
Vino blanco	0,300 V	0,700 V
Marqués de Riscal 1	11,49 ± 0,06	51,9 ± 0,2
Marqués de Riscal 2	10,9 ± 0,3	58 ± 5
Martín Códax 1	16,8 ± 0,3	67,5 ± 0,4
Martín Códax 2	19,2 ± 0,3	68,7 ± 0,1
Martín Códax 3	21 ± 1	78,9 ± 0,1
Alectum	18,9 ± 0,8	78 ± 2
Viñas del Vero	14,0 ± 0,2	64,8 ± 0,6
Viña Esmeralda	19 ± 1	55,3 ± 0,3

Tal y como se observa en la tabla 17, los valores obtenidos son mayores cuando se trabaja con un potencial de 0,700 V, lo cual es lógico ya que, como se ha explicado en el desarrollo del método, a este potencial se oxida un número mayor de polifenoles. Además, al igual que se describe en la bibliografía⁴⁴⁻⁴⁹, el contenido en compuestos polifenólicos es superior en los vinos tintos que en los blancos, y los valores aquí indicados están dentro de los valores que han sido publicados anteriormente por otros autores en la bibliografía.

IV.1.3.8. ESTUDIOS DE CORRELACIÓN DE LOS ÍNDICES ELECTROQUÍMICOS Y ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Las mismas muestras de vino han sido analizadas también empleando los métodos espectrofotométricos descritos en la bibliografía y marcados como métodos oficiales de análisis de polifenoles en vinos por la Oficina Internacional de la Viña y el Vino (OIV)⁵⁰. Así, se ha determinado el índice de polifenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu, la absorbancia a 280 nm y por último el índice de color, parámetros relacionados directamente con el contenido en compuestos polifenólicos del vino. El objetivo de estos análisis es correlacionar los datos espectrofotométricos con los electroquímicos obtenidos, ya que si bien el valor no tiene por qué coincidir, la tendencia de los resultados debería ser la misma.

En la tabla 18 se muestran los valores obtenidos para los índices espectrofotométricos estudiados, en la que se muestra la media de tres repeticiones de los equivalentes de ácido gálico (en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con la desviación estándar de la media para el índice Folin-Ciocalteu (IFC), valores de absorbancia a 280 nm (índice de polifenoles totales (IPT)) y ensayo de color (IC).

Tabla 18. Resultados del índice Folin-Ciocalteu (IFC) en equivalentes de ácido gálico ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), índice de polifenoles totales a 280 nm (IPT) e índice de color (IC)

Vino tinto	IFC	IPT (280 nm)	IC
Izadi 1	838 \pm 8	46,7 \pm 0,3	10,4 \pm 0,2
Izadi 2	873 \pm 11	51,15 \pm 0,07	9,5 \pm 0,2
Izadi 3	863 \pm 11	48,25 \pm 0,07	8,5 \pm 0,5
Izadi 4	733 \pm 8	48,9 \pm 0,1	8,1 \pm 0,2
Heredad de Torresano 1	771 \pm 8	48,9 \pm 0,3	9,8 \pm 0,1
Heredad de Torresano 2	787 \pm 10	46,0 \pm 0,1	9,5 \pm 0,2
Heredad de Torresano 3	769 \pm 1	46,9 \pm 0,1	9,5 \pm 0,3
Alcorta 1	747 \pm 9	43,4 \pm 0,1	7,9 \pm 0,5
Alcorta 2	896 \pm 13	45,7 \pm 0,4	7,6 \pm 0,5
Alcorta 3	890 \pm 12	46,8 \pm 0,1	7,6 \pm 0,4
Alcorta 4	890 \pm 16	47,5 \pm 0,2	7,9 \pm 0,1
Pueblo Viejo 1	674 \pm 9	40,4 \pm 0,8	6,4 \pm 0,2
Pueblo Viejo 2	731 \pm 7	42,7 \pm 0,4	6,1 \pm 0,5
Vino blanco	IFC	IPT (280 nm)	IC
Marqués de Riscal 1	94 \pm 4	7,51 \pm 0,07	0,18 \pm 0,05
Marqués de Riscal 2	80 \pm 2	7,65 \pm 0,04	0,24 \pm 0,01
Martín Códax 1	97 \pm 3	8,71 \pm 0,3	0,20 \pm 0,01
Martín Códax 2	102 \pm 2	8,64 \pm 0,06	0,21 \pm 0,01
Martín Códax 3	100 \pm 5	8,50 \pm 0,06	0,14 \pm 0,02
Alectum	133 \pm 3	9,64 \pm 0,06	0,23 \pm 0,01
Viñas del Vero	72 \pm 4	9,95 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01
Viña Esmeralda	115 \pm 8	4,95 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01

Los valores obtenidos para cada ensayo espectrofotométrico realizado se han representado frente a las concentraciones en equivalentes de ácido gálico obtenidas del método electroquímico a los dos potenciales de trabajo. Así mismo, se ha realizado el estudio de correlación de Pearson entre cada uno de los factores espectrofotométricos y los dos electroquímicos. En la figura 40 y en la tabla 19 se muestran los resultados de este estudio.

En ellos queda reflejada la elevada correlación entre las dos metodologías de trabajo. Este estudio de correlación abre el camino a la utilización de técnicas electroquímicas como alternativa a los estudios espectrofotométricos, los cuales son menos sensibles y menos selectivos. Además, algunos de estos métodos espectrofotométricos requieren de un tratamiento de muestra previo que consume tiempo y aumenta la posibilidad de cometer un mayor número de errores, mientras que en el método FIA con detección electroquímica se elimina este paso, lo cual da lugar a tiempos de análisis menores y mejora la calidad de los resultados obtenidos. Además, la elevada correlación obtenida de estos estudios, confirma que las respuestas se corresponden con el contenido de compuestos fenólicos presentes en este tipo de muestras.

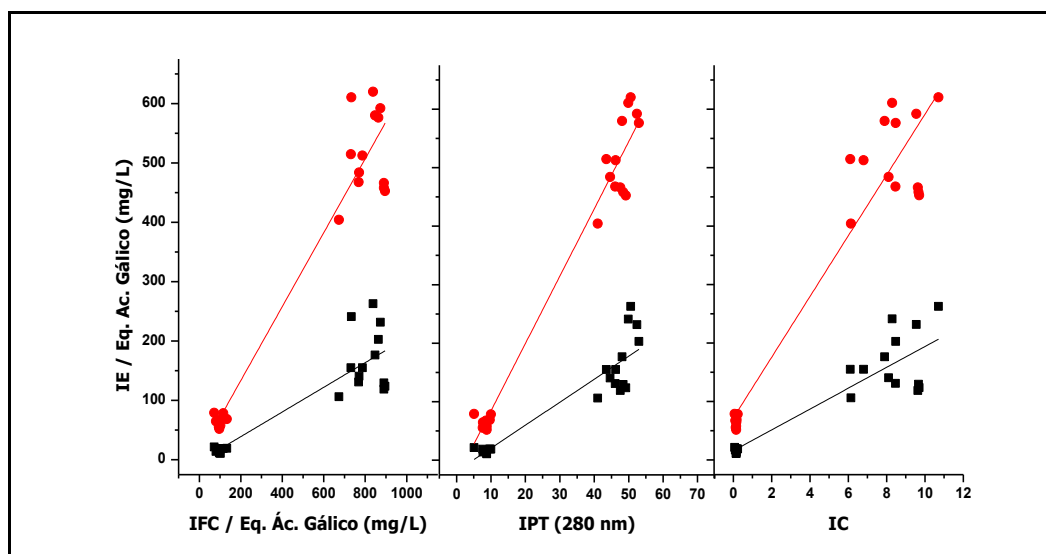


Figura 40. Correlaciones entre los índices electroquímicos a 0,300 V (negro) y 0,700 V (rojo) y los espectrofotométricos

Tabla 19. Matriz de índices de correlación de Pearson para los índices electroquímicos y espectrofotométricos

	EI 0.3 V	EI 0.7 V	IFC	I280	CI
EI 0.3 V	1	0,967	0,920	0,940	0,926
EI 0.7 V		1	0,981	0,988	0,962
IFC			1	0,996	0,985
I280				1	0,981
CI					1

En la matriz de la tabla 19 se representan los valores de correlación de Pearson (r) obtenidos para cada uno de los ensayos entre sí. Se trata de una matriz en la cual todos los elementos de la diagonal principal son iguales a la unidad ya que representan la máxima correlación (las dos variables son la misma). Para el resto de variables, valores próximos a la uno indicarían una elevada correlación. De esta forma, de manera general se puede decir que entre los ensayos electroquímicos y espectrofotométricos, existe una mayor correlación cuando se trabaja a potenciales elevados. Un potencial de trabajo de 0,700 V es menos selectivo, y su señal se relaciona con la concentración de polifenoles total igual que se relacionan con dicha concentración los parámetros espectrofotométricos determinados en este estudio. Por tanto es lógico que correlacionen mejor con el potencial más elevado y no con el potencial más bajo, que sólo representa a una fracción de polifenoles.

IV.1.4. BIBLIOGRAFÍA

1. C. G. Zoski, "*Handbook of electrochemistry*", Capítulo 1, Elsevier, Amsterdam, Holanda, 2007.
2. J. M. Pingarrón, P. Sánchez-Batanero, "*Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones*", Capítulos 1 y 3, Síntesis, Madrid, 2000.
3. J. Wang, "*Analytical electrochemistry*", Capítulos 1, 2 y 3, 2nd Edition, Wiley-VCH, New York, 2001.
4. http://iupac.org/publications/analytical_compendium/
5. A. J. Bard, L. R. Faulkner, "*Electrochemical methods. Fundamentals and applications*", Capítulo 6, 2nd Edition, Wiley & Sons, USA, 2001.
6. M. P. Cañizares Macías, "*Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica*", Journal of the Mexican Chemical Society, 46, 167-174, 2002.
7. R.J. Flanagan, D. Perret, R. Whelpton, "*Electrochemical detection in HPLC. Analysis of drugs and poisons*", Capítulo 3, RSC Chromatography Monographs, 2005.
8. T. V. Hugues, C. R. Chambers, "*Manufacture of Carbon Filament*", U.S. Patent 405,480, 1889.
9. M. Monthieux, V. L. Kuznetsov, "*Who should be given the credit for the Discovery of carbon nanotubes?*", Carbon 44, 1621-1624, 2006.
10. L. V. Radushkevich, V. M. Lukyanovich, Zh. Fiz. Khim. 26, 88, 1952.
11. W. R. Davis, R. J. Slawson, G. R. Rigby *Nature* 171, 756 (25 Abril 1953); doi:10.1038/171756a0.
12. M. Hillert, N. Lange, "*The structure of graphite filaments*", Z. Kristallogr., 111, 24-34, 1958.
13. W. Bollmann, J. Spreadborough, "*Action of Graphite as Lubricant*" *Nature* 186 (4718): 29. Bibcode:1960Natur.186...29B. doi:10.1038/186029a0, 1960.
14. R.T.K. Baker, P. S. Harris, R. B. Thomas, R. J. Waite, "*Formation of filamentous carbon from iron, cobalt and chromium catalyzed decomposition of acetylene*", Journal of Catalysis, 30, 86-95, 1973.
15. A. Oberlin, M. Endo, T. Koyama, "*Filamentous growth of carbon through benzene decomposition*", J Cryst Growth, 32, 335-349, 1976.
16. J. Abrahamson, P. G. Wiles, B. L. Rhoades, "*Structure of carbon fibres found on carbon arc anodes*". 14th Biennial Conference on Carbon, Pennsylvania. State University, University Park USA, 254-255, Junio 25-29, 1979.
17. H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, "*C₆₀: Buckminsterfullerene*". *Nature*, 318, 162-163, 1985.
18. H. G. Tennent, "*Carbon fibrils, method for producing same and compositions containing same*", U.S. Patent 4,663,230, 5 Mayo 1987.
19. S. Iijima, "*Helical microtubules of graphitic carbon*", *Nature*, 354, 56-58, 1991.
20. D. S. Bethune, C. H. Kiang, M. S. De Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, et al., "*Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single atomic layer walls*", *Nature*, 363, 603-605, 1993.

21. S. Iijima, T. Ichihashi, "Single-shell carbon nanotubes of 1 nm diameter", *Nature*, 5, 363-603, 1993.
22. P. Yáñez Sedeño, J. Riu, J. M. Pingarrón, F. X. Rius, "Electrochemical sensing based on carbon nanotubes", *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 939-953, 2010.
23. J. H. Lehman, M. Terrones, E. Mansfield, K. E. Hurst, "Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes", *Carbon*, 49, 2581-2602, 2011.
24. P. R. Damalosso, M. L. Pedano, G. A. Rivas, "Dispersion of multi-wall carbon nanotubes in polyhistidine: Characterization and analytical applications", *Analytica Chimica Acta*, 710, 58-64, 2012.
25. E. N. Primo, F. A. Gutierrez, G. L. Luque, P. R. Damalosso, A. Gasnier, Y. Jalit, M. Moreno, M. V. Bracamonte, M. Eguilaz Rubio, M. L. Pedano, M. C. Rodríguez, N. F. Ferreyra, M. D. Rubianes, S. Bollo, G. A. Rivas, "Comparative study of the electrochemical behavior and analytical applications of (bio) sensing platforms based on the use of multi-walled carbon nanotubes dispersed in different polymers", *Analytica Chimica Acta*, 805, 19-35, 2013.
26. G. Mittal, V. Dhand, K. Yop Rhee, S-J. Park, W. Ro Lee, "A review on carbon nanotubes and graphene as fillers in reinforced polymer nanocomposites", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, DOI: 10.1016/j.jiec.2014.03.022, 2014.
27. Z. Spitalsky, D. Tasis, K. Papagelis, C. Galiotis, "Carbon nanotube-polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties", *Progress in Polymer Science*, 35, 357-401, 2010.
28. Y. Jalit, M. C. Rodríguez, M. D. Rubianes, S. Bollo, G. A. Rivas, "Glassy carbon electrodes modified with multiwall carbon nanotubes dispersed in polylysine", *Electroanalysis*, 20, 1623-1631, 2008.
29. A. Sánchez Arribas, E. Bermejo, M. Chicharro, A. Zapardiel, G. L. Luque, N. F. Ferreyra, G. A. Rivas, "Analytical applications of glassy carbon electrodes modified with multi-wall carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine as detectors in flow systems", *Analytica Chimica Acta* 596, 183-194, 2007.
30. M. Ferreira, H. Varela, R. M. Torresi, G. Tremiliosi-Filho, "Electrode passivation caused by polymerization of different phenolic compounds", *Electrochimica Acta*, 52, 434-442, 2006.
31. R. F. Teófilo, R. Kiral, H. J. Geragiol, A. C. Peterlevitz, V. Baranauskas, L. T. Kubota, M. M. C. Ferreira, "QSPR Study of passivation by phenolic compounds at platinum and boron-doped diamond electrodes", *Journal of the Electrochemical Society*, 155, 640-645, 2008.
32. A. Ambrosi, T. Sasaki, M. Pumera, "Platelet graphite nanofibers for electrochemical sensing and biosensing: The influence of graphene sheet orientation", *Chemistry an Asian Journal*, 5, 266-271, 2010.
33. C. E. Banks, R. G. Compton, "Exploring the electrocatalytic sites of carbon nanotubes for NADH detection: an edge plane pyrolytic graphite electrode study", *Analyst*, 130, 1232-1239, 2005.
34. E. J. E Stuart, M. Pumera, "Nanographite impurities within carbon nanotubes are responsible for their stable and sensitive response toward electrochemical oxidation of phenols", *Journal of Physical Chemistry C*, 115, 5530-5534, 2011.

35. P. D. Astudillo, J. Tiburcio, F. J. González, "The role of acids and bases on the electrochemical oxidation of hydroquinone: Hydrogen bonding interactions in acetonitrile", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 604, 57-64, 2007.
36. A. Bayandory Moghaddam, M. Reza Ganjali, R. Dinarvand, P. Norouzi, A. A. Saboury, A. A. Moosavi-Movahedi, "Electrochemical behavior of caffeic acid at single-walled carbon nanotube: graphite-based electrode", *Biophysical Chemistry*, 128, 30-37, 2007.
37. J. Kanski, M. Aksenova, A. Stoyanova, D. A. Butterfield, "Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies", *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 273-281, 2002.
38. P. S. Guin, S. Das, P. C. Mandal, "Electrochemical reduction of quinones in different media: a review", *International Journal of Electrochemistry*, 2011, 1-22, 2010.
39. Z. Tasic, V. K. Gupta, M. M. Antonijevic, "The mechanism and kinetics of degradation of phenolics in wastewaters using electrochemical oxidation", *International Journal of Electrochemistry*, 9, 3473-3490, 2014.
40. M. Gotsi, N. Kalogerakis, E. Psillakis, P. Samaras, D. Mantzavinos, "Electrochemical oxidation of olive oil mill wastewaters", *Water Research*, 39, 4177-4187, 2005.
41. I. Streeter, G. G. Wildgoose, L. Shao, R. G. Compton, "Cyclic voltammetry on electrode surfaces covered with porous layers: An analysis of electron transfer kinetics at single-walled carbon nanotube modified electrodes", *Sens. Actuators, B* 133, 462-466, 2008.
42. <http://goldbook.iupac.org/L03540.html>
43. R. Wood, "How to validate analytical methods", *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 624-632, 1999.
44. A. Escarpa, M. C. González, "An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31, 57-139, 2001.
45. M. Seruga, I. Novak, L. Jakobak, "Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods", *Food Chemistry*, 124, 1208-1216, 2011.
46. N. Paixao, V. Pereira, J. C. Marques, J. S. Câmara, "Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC", *Journal of Separation Science*, 31, 2189-2198, 2008.
47. A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, M. A. Lage-Yusty, M. J. López-Hernández, "HPLC analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay", *Food Research International*, 42, 1018-1022, 2009.
48. P. A. Kilmartin, H. Zou, A. L. Waterhouse, "Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response", *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 294-302, 2002.
49. O. Makhotkina, P. Kilmartin, "The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide", *Analytica Chimica Acta*, 668, 155-165, 2010.
50. <http://www.oiv.int/oiv/info/esmethodesanalyses>

**IV.2 DETERMINACIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS
UTILIZANDO ELECTROFORESIS
CAPILAR**

IV.2.1. INTRODUCCIÓN: FUNDAMENTOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR

IV.2.1.1. ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar es una técnica de separación en la cual las sustancias se separan en función de su diferente movilidad, en sentido y velocidad, bajo la acción de un elevado campo eléctrico.

Los primeros trabajos se deben al químico sueco Tiselius¹ con la descripción del fundamento de la electroforesis como técnica de separación, en 1930 y con su posterior aplicación en la separación de las proteínas constituyentes del suero humano² en 1937. Sin embargo, la introducción de esta herramienta analítica usada en columnas en los laboratorios no se produjo hasta años más tarde, en 1974, cuando Virtanen³ demostró las ventajas que se obtenían al realizar separaciones electroforéticas en tubos de vidrio de unas pocas micras de diámetro interno. Un poco más adelante, en el año 1979, Mykkers y colaboradores⁴ consiguieron realizar separaciones electroforéticas en tubos de teflón de 200 μm de diámetro interno con alturas de plato teórico inferiores a 10 μm . La consolidación de la electroforesis capilar como herramienta de trabajo no llegó hasta el año 1981, gracias a los trabajos de Jorgenson y Lukacs^{5,6}. En ellos se emplean por primera vez capilares de sílice fundida de 75 μm de diámetro interno para llevar a cabo separaciones, se describe con claridad la teoría de la separación electroforética en columna, se exponen las relaciones entre los parámetros operacionales y la eficacia de la separación y se demuestra el potencial de la electroforesis capilar como técnica analítica. Estos trabajos son considerados el punto de partida que lleva a la concepción actual de la electroforesis capilar.

La electroforesis capilar presenta una serie de ventajas muy importantes que la han llevado a ser uno de los principales sistemas elegidos en el estudio de un número de analitos muy amplio presentes en diferentes tipos de muestras. De estas ventajas cabe destacar^{7,8}:

- Elevada eficacia (entre 10^5 y 10^6 platos teóricos)
- Rápidas separaciones
- Rápida optimización de métodos
- Bajo coste, así como bajo consumo de reactivos y muestra, dando lugar por tanto a un bajo impacto ambiental
- Orden de migración de analitos fácilmente predecible
- Fácilmente automatizable

Una de las limitaciones más importantes en el uso de esta técnica es lograr que el sistema de detección proporcione una sensibilidad adecuada, especialmente cuando se hace uso de la detección espectrofotométrica, la más ampliamente utilizada. Esto es debido a que las dimensiones del diámetro interno del capilar (inferior a 75 μm) y el pequeño volumen de muestra introducido (del orden de unos pocos nL) dificultan alcanzar altas sensibilidades por los pequeños pasos ópticos y la escasa masa de analito que alcanza el sistema de detección.

En esta técnica de separación no cromatográfica, la migración de las sustancias cargadas, desde un vial que contiene la muestra a un vial destino que contiene disolución tampón, se produce en el interior de un capilar bajo la influencia de un campo eléctrico elevado de corriente continua, tal y como se muestra en la figura 41. El medio de separación se denomina medio electroforético y es una disolución tampón que actúa como conductor de la corriente a la vez que controla la carga de las especies presentes en la muestra.

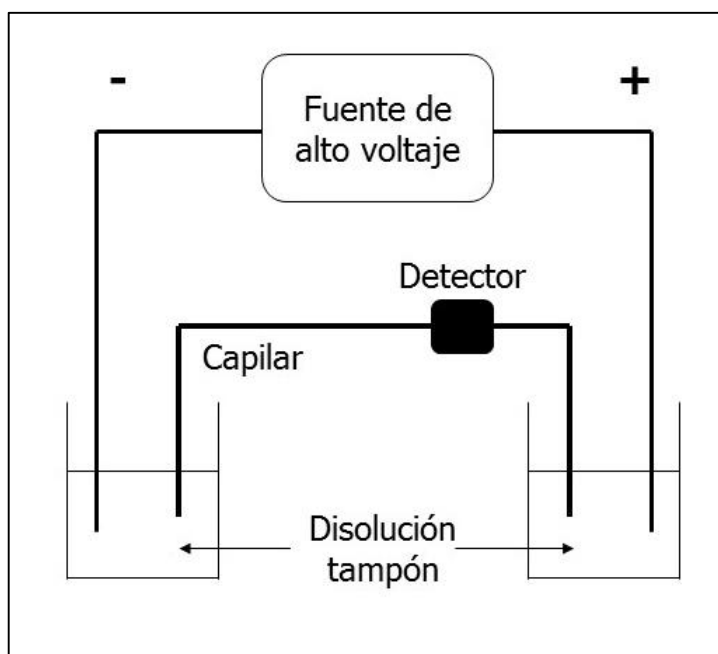


Figura 41. Esquema de la separación por electroforesis capilar

El movimiento de las especies a separar se rige por dos fenómenos que ocurren de forma simultánea: electromigración y electroósmosis.

IV.2.1.1.1. Electromigración⁷

Las fuerzas electrostáticas a las que están sometidas las sustancias como consecuencia del campo eléctrico generado, provocan el movimiento de las partículas cargadas con una velocidad lineal de migración electroforética, v_{ep} ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), proporcional a dicho campo (ecuación 6).

$$v_{ep} = \mu_{ep}E$$

Ecuación 6. Velocidad electroforética

El campo eléctrico, E (V), a su vez viene determinado por el voltaje aplicado y la longitud de capilar. El pequeño diámetro de los capilares hace que estos sean capaces de disipar fácilmente el calor que se origina, por lo que se pueden aplicar campos eléctricos muy elevados que dan lugar a separaciones más rápidas y eficientes.

La proporcionalidad viene dada por una constante (μ_{ep}) que se denomina movilidad electroforética cuyas unidades son $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}$. La movilidad electroforética es una propiedad de cada partícula y representa la velocidad media de una especie cargada por unidad de campo eléctrico. Su expresión se indica en la ecuación 7.

$$\mu_{ep} = \frac{q_i}{6\pi r_i \eta}$$

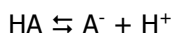
Ecuación 7. Expresión para la movilidad electroforética

En donde q_i es el valor de la carga neta del ion (C), r_i el radio (cm) y η la viscosidad del medio ($\text{Kg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Debido a que la movilidad electroforética de un ion depende de la relación carga/radio, el pH del tampón es la variable experimental más influyente en la selectividad del sistema electroforético. El tamaño de un ion depende de su masa molecular y del grado de hidratación, y su carga del grado de ionización.

Para ácidos y bases débiles, el grado de ionización depende de la constante de ionización del grupo ácido o básico y del pH de la disolución. Cuando el analito es un ion que procede de un ácido o base fuerte, el pH no afecta a su carga neta y cuando se trata de un anfótero (aminoácidos, proteínas y péptidos por ejemplo), el cual presenta grupos ácidos y básicos débiles en su molécula, el pH del medio tiene especial importancia, ya que determina la carga neta del analito.

La disociación de un ácido débil monoprótico viene dado por:



Para un valor de pH del tampón cercano al valor del pK_a del ácido (± 2 unidades), se encuentran en disolución las moléculas sin ionizar y sus correspondientes iones. Como el equilibrio ácido-base es rápido, la fracción de tiempo que el analito permanece en forma cargada es igual al grado de disociación (α). La movilidad efectiva (μ_{ef}) por lo tanto será una fracción de la movilidad electroforética absoluta (μ_{abs}), que se corresponde con la que se debería observar para el ion totalmente cargado y viene dada por la expresión de la ecuación 8:

$$\mu_{ef} = \alpha \mu_{abs}$$

Ecuación 8. Movilidad electroforética dependiente del grado de disociación

El grado de disociación representa el cociente entre la concentración de la especie cargada y la concentración total de analito y se calcula mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach⁹ (ecuación 9):

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \text{pK}_a + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

Ecuación 9. Ecuación de Henderson-Hasselbach

Despejando α de la ecuación 9 y sustituyendo el valor en la ecuación 8, se obtiene la expresión que relaciona la movilidad efectiva de un ácido débil con su valor de pK_a y el pH de la disolución tampón¹⁰ (ecuación 10).

$$\mu_{ef} = \frac{\mu_{abs}}{1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}}}$$

Ecuación 10. Movilidad efectiva de un analito en función del pH y su valor de pK_a

La temperatura es otro factor influyente en la movilidad electroforética de una sustancia, puesto que afecta directamente a la viscosidad del medio que está relacionada inversamente con la movilidad electroforética, tal y como se muestra en la ecuación 7. Si la temperatura aumenta, la viscosidad del medio disminuye y la movilidad electroforética es mayor.

IV.2.1.1.2. Electroósmosis⁷

La electroósmosis es un fenómeno que se produce durante la aplicación de un campo eléctrico a un sistema líquido en contacto con una superficie cargada, como puede ser el interior de una columna capilar. Durante este proceso se genera un movimiento global de la disolución conocido como flujo electroosmótico entre los extremos del campo eléctrico aplicado.

La mayoría de las columnas capilares empleadas actualmente en CE están fabricadas de materiales de sílice. En medios acuosos este tipo de superficies poseen un exceso de cargas negativas que puede resultar de la ionización de los grupos funcionales de la superficie (procesos de equilibrio ácido-base) y/o adsorción de especies iónicas. En la superficie de la pared de sílice fundida del capilar probablemente ocurren ambos procesos: los grupos silanol (SiOH) se van desprotonando paulatinamente entre pH 3 y 8, considerando que no se disociarán mucho más cuando el pH es mayor de 8, y atraerán iones del medio para mantener el balance de cargas del sistema. Estos iones se disponen a lo largo de la pared, formando una doble capa adyacente a la misma, descrita por el modelo de Stern de la doble capa. En este modelo, la primera capa, denominada "capa fija", está formada por los iones que neutralizan parcialmente la carga de las paredes de la columna. El exceso de cationes solvatados móviles presentes en la disolución se dispone neutralizando la carga negativa remanente, dando lugar a una segunda capa, denominada "capa móvil o difusa". Durante la aplicación de un elevado campo eléctrico, esta segunda capa puede moverse mientras la primera permanece prácticamente fija. Como los cationes están solvatados, arrastran el agua asociada, dando lugar a un movimiento neto de la disolución hacia el cátodo, fenómeno conocido como flujo electroosmótico. En la figura 42 se muestra un esquema de este proceso.

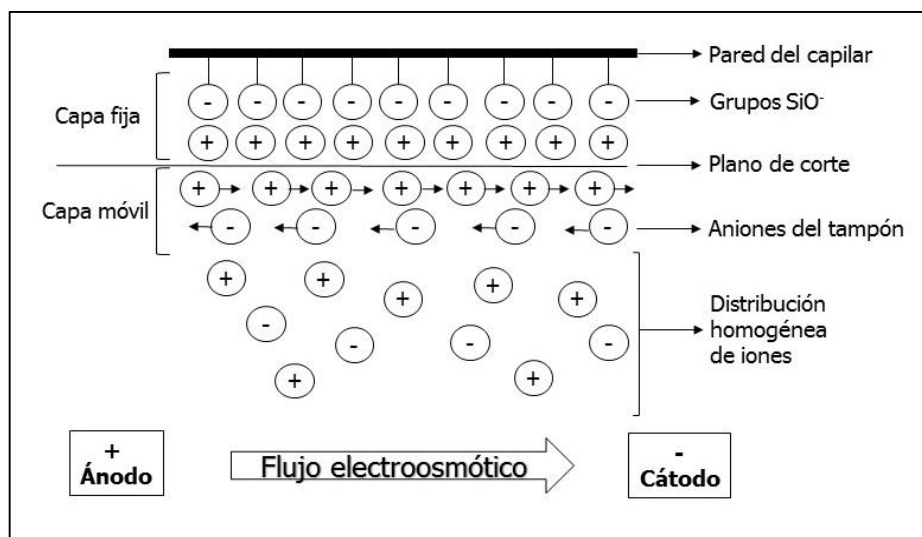


Figura 42. Doble capa y flujo electroosmótico

En el plano de corte de ambas capas se produce una descompensación eléctrica que genera un potencial denominado potencial zeta, ζ (V), el cual depende de la cantidad de iones (contraiones) que interaccionan electrostáticamente con la superficie cargada del capilar y que viene dado por la expresión de la ecuación 11. El número de iones adsorbidos viene determinado parcialmente por el pH y la fuerza iónica de la disolución. Como el potencial zeta se relaciona con la movilidad electroosmótica μ_{eo} ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) mediante la expresión de la ecuación 12, ésta es dependiente de las características de la disolución tampón e independiente de la naturaleza de los analitos a separar.

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e_0}{\varepsilon}$$

Ecuación 11. Expresión para el potencial zeta ζ

En donde δ (cm) corresponde al espesor de la doble capa, e_0 , es la carga fundamental y ε ($\text{C} \cdot \text{m} \cdot \text{V}^{-1}$) la constante dieléctrica del medio.

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta}$$

Ecuación 12. Expresión para la movilidad electroosmótica

Es fácil deducir que a pH elevado, al cual los grupos silanol estarán en su mayoría cargados negativamente, el potencial zeta y por tanto el flujo electroosmótico serán más elevados que a pH bajo. Además, se pueden aplicar otras estrategias con el objetivo de controlar el flujo electroosmótico, como por ejemplo:

- Alteración de la fuerza iónica de la disolución.
- Introducción de modificadores orgánicos que varíen la viscosidad del medio.
- Recubrimiento de la pared interna del capilar con surfactantes catiónicos o polímeros neutros hidrofílicos.
- Modificación de las paredes del capilar con enlaces covalentes.
- Control de la temperatura del capilar.
- Variación del campo eléctrico aplicado.

La expresión de la movilidad electroosmótica se emplea en la definición de la velocidad lineal v_{eo} ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) que viene dada por la expresión:

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} E$$

Ecuación 13. Expresión para la velocidad lineal

Una característica muy importante del flujo electroosmótico es que presenta un perfil casi plano, en contraste con el perfil parabólico que se produce al inyectar un líquido a través de una columna mediante presión (figura 43) como se hace por ejemplo en cromatografía, FIA, etc. El perfil plano no contribuye de manera significativa al ensanchamiento de banda, dando lugar a separaciones con mayor eficacia y resolución.

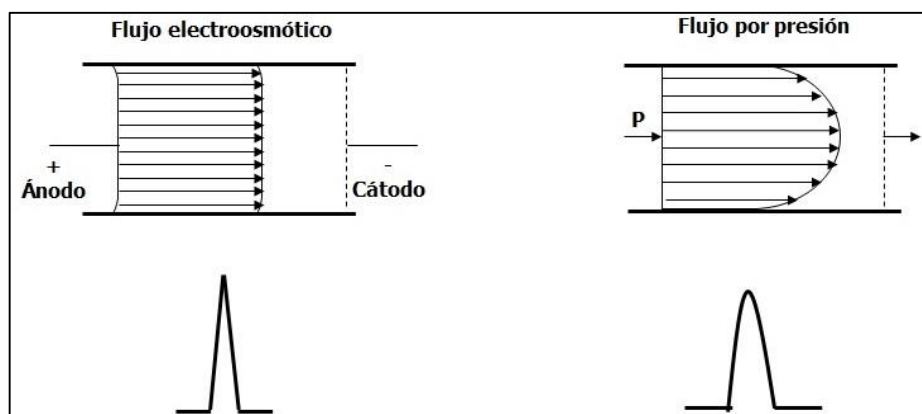


Figura 43. Perfiles de flujo

Este perfil casi plano solo se ve alterado en el límite entre la “capa fija” y la “capa móvil”, debido al rozamiento entre ambas capas y la caída del potencial zeta en la capa fija, de aquí su apelativo “casi plano”.

Teniendo en cuenta los dos procesos explicados, la movilidad neta de una sustancia, μ , vendrá determinada por la suma de las dos movilidades (ecuación 14):

$$\mu = \mu_{ep} + \mu_{eo}$$

Ecuación 14. Movilidad neta de una sustancia

IV.2.1.1.3. Orden de migración en procesos de electroforesis capilar de zona simple⁸

El orden de migración de los analitos es fácilmente predecible, como se puede esperar de las expresiones que hemos revisado anteriormente (figura 44). En primer lugar migrarán las sustancias catiónicas de pequeño tamaño y carga elevada, a continuación las sustancias catiónicas de gran tamaño y carga pequeña, después, a la velocidad del flujo electroosmótico, las sustancias neutras que migrarán de forma conjunta, le seguirán las sustancias aniónicas de elevado tamaño y carga baja y en último lugar, las sustancias aniónicas de pequeño tamaño y carga elevada.

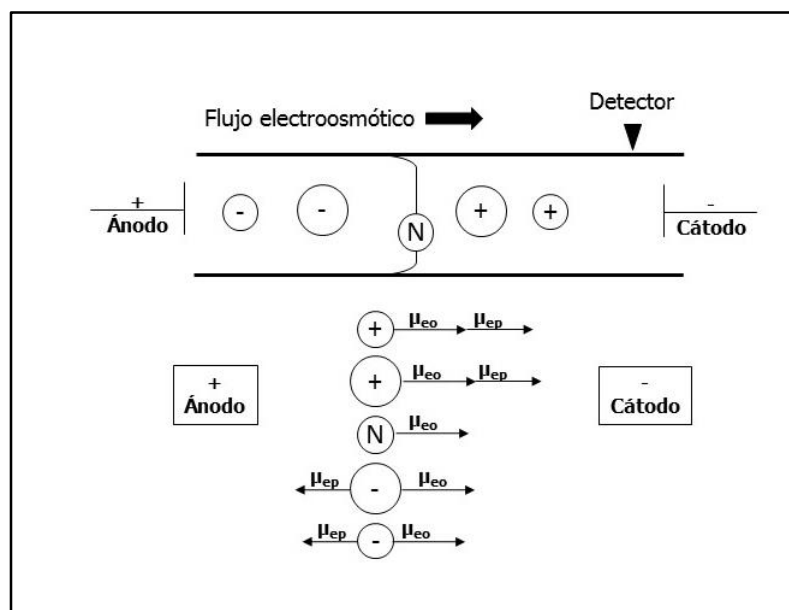


Figura 44. Esquema de separación en electroforesis capilar

IV.2.1.1.4. Efecto Joule⁸

Un hecho a tener en cuenta cuando se trabaja en electroforesis, en general, es que cuando se aplica una diferencia de potencial, U (V), en un medio conductor, se genera una corriente, I (A), de acuerdo con la Ley de Ohm (ecuación 15):

$$U = IR$$

Ecuación 15. Ley de Ohm

El paso de esta corriente por el conductor provoca una pérdida de parte de la energía aplicada en forma de calor en función de su resistencia, R (Ω) y que genera una potencia, P (W), dada por la ecuación 16:

$$P = UI = RI^2$$

Ecuación 16. Potencia generada por el paso de corriente

Este fenómeno se conoce como *efecto Joule* y es uno de los mayores problemas que se producen al realizar una separación electroforética clásica en base de gel o en soportes planos, ya que el calor generado calienta la disolución, lo que provoca la aparición de gradientes de temperatura y cambios locales en la viscosidad que ensanchan las zonas ocupadas por los solutos, limitando la eficacia y resolución en la separación.

Por otra parte, el calor producido por unidad de volumen, Q ($\text{W}\cdot\text{cm}^{-3}$), en un tubo abierto se relaciona con el campo eléctrico aplicado, E , la conductancia de la disolución, Λ ($\text{cm}^2\cdot\Omega^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), y la concentración de electrolito, C ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), según la expresión de la ecuación 17:

$$Q = E^2 \Lambda C$$

Ecuación 17. Calor producido

Por tanto, la cantidad de calor generado aumenta al aumentar el campo eléctrico aplicado y la concentración de la disolución haciendo necesario su control.

Una de las ventajas más importantes que surgen del uso de capilares de sílice de pequeño diámetro interno es su capacidad para disipar este calor, ya que la conductancia térmica de sus paredes es mayor que la de la disolución. Por ello, al disminuir el diámetro interno del capilar, aumenta la superficie expuesta a la disolución y el calor se disipa más rápidamente. Esta situación permite a la electroforesis capilar hacer uso de una variable que suponía una gran limitación en los procesos de separación electroforética clásica en base de gel o electroforesis plana, el uso de elevados voltajes de separación.

Los parámetros⁸ que caracterizan las separaciones electroforéticas en columna, influidos por la movilidad electroforética y flujo electroosmótico, así como por el voltaje aplicado y tamaño del capilar son el tiempo de migración, eficacia, resolución y selectividad, los cuales se definen a continuación:

IV.2.1.1.5. Tiempo de migración

Es el tiempo que emplea un analito en desplazarse por el interior del capilar desde el lugar de su introducción hasta el punto de detección. Durante este tiempo recorre una distancia l (cm) conocida como longitud efectiva. El cálculo del tiempo de migración se hace utilizando la expresión de la ecuación 18:

$$t_m = \frac{lL}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}$$

Ecuación 18. Tiempo de migración

En donde l (cm) es la longitud efectiva, L (cm) la longitud completa del capilar, μ_{ep} y μ_{eo} son las movilidades electroforética y electroosmótica respectivamente y V (V) es el voltaje aplicado entre los extremos de la columna capilar.

IV.2.1.1.6. Eficacia

La eficacia en un sistema de electroforesis capilar viene definida por el número de platos teóricos (N) logrados en el capilar. A su vez, estos están relacionados con la dispersión debida a la difusión, σ_D (cm), de la zona ocupada por el analito durante el proceso de separación. Así, el cálculo de la eficacia se hace empleando la expresión de la ecuación 19:

$$N = \left(\frac{L}{\sigma_D} \right)^2$$

Ecuación 19. Cálculo del número de platos teóricos. Eficacia de separación

Desde un punto de vista teórico, la única fuente de dispersión en electroforesis capilar es la difusión axial y puede ser expresada en función de su varianza espacial (σ_D^2) mediante la ecuación de Einstein:

$$\sigma_D^2 = 2Dt$$

Ecuación 20. Ecuación de Einstein para la difusión axial

En donde $D(\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1})$ es el coeficiente de difusión del analito y $t(\text{s})$ el tiempo que necesita para llegar al final de la columna capilar.

Sustituyendo la ecuación 20 en 19, se obtiene la siguiente expresión para el número de platos teóricos:

$$N = \frac{L^2}{2Dt} = \frac{\mu V}{2D}$$

Ecuación 21. Número de platos teóricos

Para un analito cualquiera, el coeficiente de difusión y la movilidad total son constantes y por tanto, el número de platos teóricos sólo depende del voltaje aplicado, incrementándose a voltajes elevados.

Experimentalmente, el cálculo para el número de platos teóricos puede hacerse utilizando las expresiones que se indican en las ecuaciones 22 y 23:

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{W} \right)^2$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_m}{W_{1/2}} \right)^2$$

Ecuaciones 22 y 23. Cálculo experimental del número de platos teóricos

En donde $t_m(\text{s})$ es el tiempo de migración y W la anchura de pico en la línea base y $W_{1/2}$ la anchura de pico en la mitad de su altura.

IV.2.1.1.7. Resolución

La resolución define la capacidad para separar dos analitos de una mezcla. También se define como el cociente entre la distancia entre los dos picos y la media de las anchuras de los picos en su base. Para el cálculo experimental de la resolución pueden emplearse las ecuaciones 24 o 25:

$$R = \frac{2(t_{mA} - t_{mB})}{W_A + W_B}$$

$$R = \frac{(t_{mA} - t_{mB})}{W_{1/2A} + W_{1/2B}}$$

Ecuaciones 24 y 25. Cálculo experimental de la resolución

Según se empleen el ancho de pico en la línea base (W) o a media altura ($W_{1/2}$), especialmente dependiendo de si los picos son simétricos o no.

IV.2.1.1.8. Selectividad

La selectividad se refiere a la separación existente entre dos picos y viene dada por el factor de separación (α), que se define como el cociente entre los factores de capacidad de los analitos a separar, ecuación 26:

$$\alpha = \frac{k_A}{k_B} = \frac{t_{mA} - t_0}{t_{mB} - t_0}$$

Ecuación 26. Cálculo del factor de separación

Esta expresión se emplea mucho en cromatografía, en la cual t_0 corresponde al tiempo muerto de la columna. En electroforesis capilar no existe este concepto y este término se sustituye por el tiempo de migración de un soluto neutro, que viene determinado por la movilidad electroosmótica únicamente.

IV.2.1.2. INTRODUCCIÓN DE MUESTRA

La introducción de muestra^{7, 8} es un factor muy importante en electroforesis capilar para obtener las eficacias de separación esperadas, ya que este proceso no debe inducir al ensanchamiento de las zonas de analitos separadas. Para ello, deben introducirse de forma eficiente y reproducible pequeños volúmenes de muestra. Existen dos modos generales de introducción de muestra cuyo uso está ampliamente extendido: introducción electrocinética e introducción hidrodinámica.

IV.2.1.2.1. Introducción electrocinética

De forma general, consiste en la incorporación de una cantidad de muestra en el interior de la columna, como consecuencia de la aplicación de un elevado voltaje durante un tiempo determinado. En el extremo anódico de la columna capilar se sitúa un vial con la muestra al cual se le aplica un cierto voltaje que hace que la muestra se introduzca en el sistema por el movimiento del flujo electroosmótico y por la movilidad electroforética de los analitos. Cuando se emplea esta forma de introducción de muestra, se produce la acumulación en cabeza de columna de los compuestos catiónicos o aniónicos dependiendo de la polaridad del voltaje aplicado, por lo que este sistema tiene un cierto efecto de preconcentración. Si bien es una forma de introducción de muestra discriminativa, suele generar graves problemas de reproducibilidad cuando se aplica repetidas veces sobre un mismo vial de muestra, al incorporar en cabeza de columna una mayor o menor cantidad de analitos, generando un gradiente negativo de concentración en aquellos compuestos con mayor movilidad electroforética bajo las condiciones del proceso de introducción de muestra.

La cantidad de muestra introducida Q_{in} se puede calcular empleando la ecuación 27.

$$Q_{in} = \frac{V\pi Ctr^2}{L}(\mu_{ep} + \mu_{eo})$$

Ecuación 27. Cantidad de muestra introducida en columna capilar empleando introducción de muestra electrocinética

En donde V (V) es el voltaje aplicado, C (mol·L⁻¹) la concentración de la muestra, t (s) el tiempo de aplicación del voltaje en la introducción de muestra, r^2 (cm) el diámetro interno del capilar, L (cm) la longitud de la columna capilar y μ_{ep} y μ_{eo} las movilidades electroforética y electroosmótica respectivamente.

IV.2.1.2.2. Introducción hidrodinámica

Con este modo se introduce una pequeña porción de muestra de forma no discriminativa en el interior de la columna capilar. Existen dos procedimientos para llevarla a cabo: sifonación o gravitacional y presión.

En la sifonación, la elevación física del vial que contiene la muestra produce una diferencia de los niveles de las disoluciones, y por lo tanto de la presión, que obliga a una porción de muestra a introducirse en el sistema para compensar la diferencia de presión generada como consecuencia de la variación de nivel.

En el segundo tipo, se aplica una presión extra para obligar a la muestra a introducirse en el interior del capilar. En esta forma, se pueden dar dos tipos de introducción: introducción hidrodinámica de presión e introducción hidrodinámica de vacío, según se ejerza la presión en el vial fuente o destino respectivamente.

Para calcular el volumen de muestra introducido de forma hidrodinámica se aplica la ecuación de Poiseuille:

$$V_i = \frac{\Delta P r^4 \pi t}{8 \eta L}$$

Ecuación 28. Ecuación de Poiseuille para calcular el volumen de muestra introducido mediante introducción hidrodinámica por presión

En donde V_i es el volumen de muestra introducido (cm³), r (cm) el radio del diámetro interno de capilar, η (N·s·m⁻²) la viscosidad del medio, L (cm) la longitud del capilar y t el tiempo de aplicación de la presión.

IV.2.1.3. MODOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR

Existen diferentes modos de separación en electroforesis capilar⁹ que amplían y permiten su utilización para los variados y diversos tipos de muestras y analitos. Dentro de ellos están:

IV.2.1.3.1. Electroforesis capilar en zona libre (CZE)

Es el modo que más se utiliza en electroforesis capilar, principalmente por su simplicidad ya que solo se emplea una única disolución de separación que rellena el capilar y cuyas propiedades determinarán la separación. Esta es debida a la distinta movilidad de los analitos al aplicar un campo eléctrico en estas condiciones, migrando en zonas discretas y a distinta velocidad, no alcanzándose en ningún momento un estado estacionario. En este modo está presente el flujo electroosmótico y es controlado principalmente mediante la naturaleza de la disolución de separación. La movilidad de los distintos solutos puede ser convenientemente alterada mediante aditivos que varían el flujo electroosmótico, forman complejos y pares iónicos o facilitan su solubilidad.

El inconveniente más importante de este modo es que permite separar especies cargadas con cargas diferentes y compuestos neutros, pero no permite la separación de diferentes compuestos neutros entre sí.

IV.2.1.3.2. Cromatografía electrocinética capilar micelar (MEKC)

Con este modo de electroforesis capilar se combinan los principios de la electroforesis y de la cromatografía, teniendo en cuenta por tanto los conceptos de flujo electroosmótico y movilidad electroforética, así como la distribución entre fase móvil y fase estacionaria.

Cuando se trabaja con MEKC se incluyen fases pseudoestacionarias en la disolución tampón empleada en la separación, obtenidas mediante la adición de sustancias generalmente con propiedades tensoactivas en concentración superior a la concentración micelar crítica (CMC). Estas sustancias poseen una cabeza hidrofílica y una cadena larga de carácter hidrofóbico y en disoluciones acuosas, cuando la concentración supera la concentración micelar crítica, se asocian formando agregados en los cuales orientan la cola hidrofóbica hacia el interior de una esfera que por fuera presenta carácter hidrofílico por las cabezas polares que se disponen hacia el exterior de la misma.

El mecanismo de separación se basa en la distribución entre la fase micelar pseudo estacionaria y la disolución tampón empleada en la separación. El analito se distribuirá entre ambas fases en función de su hidrofobicidad y su velocidad de migración variará dependiendo de su coeficiente de distribución entre fases. Los compuestos muy hidrófobos permanecerán en el interior de la micela migrando a la misma velocidad que ella, mientras los poco hidrófobos permanecerán prácticamente en la disolución, migrando a la velocidad del flujo electroosmótico.

IV.2.1.3.3. Electroforesis capilar en geles (CGE)

Se basa en el movimiento de sustancias, bajo la influencia de un campo eléctrico elevado, entre los huecos formados por geles o tamices moleculares de los que se ha rellenado el capilar.

La electroforesis capilar en gel ha sido desarrollada con la finalidad de separar sustancias que presentan relaciones carga/tamaño parecidas y no pueden ser separadas por CZE, como por ejemplo el ADN, proteínas o ácidos nucleicos.

IV.2.1.3.4. Isotacoforesis capilar (CITP)

En este modo se emplean dos disoluciones tampón, caracterizadas por la gran diferencia en la movilidad electroforética de sus iones, entre las cuales se sitúa la muestra. Esto hace que, cuando se aplica el campo eléctrico, los analitos se ordenan gradualmente y en función de sus movilidades electroforéticas para formar diferentes bandas que finalmente migran de forma consecutiva y a la misma velocidad. Se emplea para la separación de sustancias iónicas aunque no es posible la separación de aniones y cationes en un solo análisis. También se emplea como método de preconcentración previo a otros modos de electroforesis capilar.

IV.2.1.3.5. Isoelectroenfoque capilar (CIEF)

La separación se basa en los diferentes puntos isoeléctricos (pI) de los analitos a separar y se utiliza para ello una mezcla de anfóteros con capacidad reguladora a distintos pI como tampón de separación. Se ha aplicado mayoritariamente en la separación de proteínas, péptidos y aminoácidos.

IV.2.1.3.6. Electrocromatografía capilar (ECC)

Este modo es un híbrido entre HPLC y electroforesis capilar. Los capilares de sílice se empaquetan con las fases estacionarias típicas de HPLC en fase reversa, aplicándose un voltaje a través del capilar empaquetado que genera un flujo electroosmótico y que da lugar a la separación por este modo electroforético. La separación de los analitos neutros se basa en fenómenos de reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

El modo de trabajo de esta Tesis ha sido la electroforesis capilar en zona. Las especies estudiadas presentan diferentes grados de ionización en función del pH del medio en el que se encuentren, y entre algunas de ellas el tamaño es bastante diferente. Esto hace posible emplear este modo de trabajo, que además de presentar un elevado poder de separación, es el más sencillo de los descritos.

IV.2.1.4. SISTEMAS DE DETECCIÓN

Los detectores⁷⁻⁹ empleados en electroforesis capilar son similares en diseño a los utilizados en HPLC con la diferencia de que en una separación electroforética, las bandas de analito pasan a través del detector a diferentes velocidades por lo que las áreas de pico van a depender de los tiempos de migración, algo que no ocurre en HPLC, donde todos los compuestos pasan a la misma velocidad a través del detector.

Por otro lado, las dimensiones reducidas de los capilares empleados y los pequeños volúmenes de muestra suponen un problema a la hora de conseguir sensibilidad sin dar lugar a un ensanchamiento de zona. La forma más eficaz de solventar este problema es empleando la detección en columna. Por ello, los sistemas de detección más utilizados son la absorción UV-Vis, la fluorescencia, detección amperométrica y la espectrometría de masas. En la tabla 20 se resumen los detectores empleados con los diferentes límites de detección obtenidos¹¹.

En general, un detector debe cumplir una serie de requisitos para poder ser acoplado a un sistema de separación:

- Respuesta rápida a un cambio de concentración de analito.
- Sensibilidad lo suficientemente elevada como para que se produzcan cambios en la señal para cambios mínimos en la concentración de analito.
- No debe perjudicar a la eficacia de la separación.
- La señal en ausencia de analito debe ser nula (forma ideal) o lo menor posible. La ausencia completa de señal es prácticamente inexistente, produciéndose siempre unas señales conocidas como señal o ruido de fondo. Esta señal de fondo no debe perturbar la señal de analito por lo que debe ser lo más pequeña y constante posible para dar lugar a la máxima relación entre la señal de analito y el ruido.
- Debe dar lugar a señales fiables, reproducibles y estables en el tiempo.
- Debe proporcionar un amplio intervalo lineal, en el cual se produzcan cambios de señal con la concentración que presenten relación lineal en el mayor intervalo de concentraciones posible.
- Debe presentar bajos límites de detección. Para obtenerlos es necesaria una elevada sensibilidad y una baja fluctuación de la señal de fondo.

Tabla 20. Límites de detección de los diferentes detectores acoplados a un sistema de electroforesis capilar¹¹

Sistema de detección		Límite de detección / M
Técnicas de detección ópticas		
Absorción UV-Visible	Directa	10^{-5} - 10^{-7}
	Indirecta	10^{-4} - 10^{-6}
	Con paso óptico aumentado	10^{-7}
Fluorescencia	Directa	10^{-7} - 10^{-9}
	Indirecta	10^{-6} - 10^{-8}
	Inducida por láser directa	10^{-10} - 10^{-13}
	Inducida por láser indirecta	10^{-5} - 10^{-7}
Fosforescencia a temperatura ambiente en estado líquido		10^{-6} - 10^{-8}
Quimioluminiscencia		10^{-5} - 10^{-11}
Termoóptico		10^{-7} - 10^{-8}
Índice de refracción		10^{-5} - 10^{-7}
Espectroscopía Raman		10^{-3} - 10^{-7}
Técnicas electroquímicas		
Conductimetría		10^{-7} - 10^{-8}
Potenciometría		10^{-7} - 10^{-8}
Amperometría		10^{-7} - 10^{-9}
Otras técnicas		
Espectrometría de masas		10^{-7} - 10^{-9}
Radiométricos		10^{-10} - 10^{-11}

Dado que uno de los objetivos de esta Tesis es el desarrollo de un método de separación y detección de polifenoles en muestras de vino mediante electroforesis capilar con detección electroquímica, se hará un mayor hincapié a las técnicas electroquímicas de detección. Tal y como se ha explicado en el punto IV.1.1, dicha detección está basada en las propiedades electroquímicas y eléctricas que presentan las especies en el medio electroforético.

Los detectores electroquímicos presentan cualidades que los hacen idóneos para ser acoplados a electroforesis capilar siendo destacable su perfecta adaptación a las dimensiones físicas del capilar sin pérdida de sensibilidad, así como su sencillez y bajo coste. Sin embargo, también presentan inconvenientes que han hecho que este tipo de detección haya sido escasamente introducida en equipos comerciales, en especial la necesidad de aislar el detector de los elevados voltajes de separación y el requerimiento de un perfecto alineamiento de la columna capilar los electrodos.

Existen tres tipos principales de detección electroquímica: conductimétrica, potenciométrica y amperométrica.

Conductimétrica: la señal obtenida está relacionada con los cambios de conductividad que se producen entre las zonas de migración en el interior de la columna. Tiene carácter universal dado que cualquier ion puede producir un cambio de este tipo y está influida por el volumen de la celda de detección y por tanto por las dimensiones internas del capilar.

Potenciométrica: es la menos utilizada y está basada en la transferencia selectiva de un ion en disolución dentro de una membrana generalmente de tipo lipofílico, generando una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana que es proporcional a la concentración del analito, teniendo en cuenta que, según la ecuación de Nerst, la diferencia de potencial, bajo condiciones ideales, está representada por una función lineal del logaritmo de las actividades del ion en ambas disoluciones. Su principal inconveniente viene dado por la dificultad de fabricación de membranas de diámetro similar al de los capilares y la alineación de la salida de columna con los electrodos.

Amperométrica: es la más empleada y está basada en la medida de la corriente resultante de un proceso de oxidación o reducción de sustancias electroactivas en la superficie de un electrodo como consecuencia de la aplicación de una diferencia de potencial entre dicho electrodo (denominado electrodo de trabajo) y un electrodo de referencia sumergidos en una disolución de electrolito. La corriente resultante es proporcional al número de electrones intercambiados en el proceso electroquímico y a la concentración de la especie en disolución. Se trata de una detección selectiva por ser capaz de distinguir entre sustancias electroactivas (detectables) y las que no lo son (no detectables) y, con una buena selección del potencial, entre sustancias electroactivas con diferencias significativas en sus potenciales redox. Los inconvenientes de trabajar con este tipo de detección son principalmente dos:

- Necesidad de aislar la celda de detección de los elevados voltajes empleados en la separación: cuando se trabaja con detección amperométrica, en general se emplea una celda con tres electrodos, uno de trabajo, uno de referencia y uno auxiliar. Dicha celda se acopla al sistema de electroforesis al final de columna, y, dado que la magnitud de corriente de separación es del orden de seis veces superior a la corriente faradaica que se produce como consecuencia de la reacción electródica, aquellas provocan una elevada interferencia en el sistema de detección.
- El modo de alineamiento entre la columna capilar y el electrodo de trabajo.

Este ha sido el sistema elegido para el desarrollo de un método que permita la separación y detección, para su posterior cuantificación, de compuestos polifenólicos presentes en vinos blancos. Para ello se ha empleado el electrodo modificado con nanotubos de carbono en una celda electroquímica acoplada a un equipo de separación por electroforesis capilar. Este acoplamiento ha sido ampliamente desarrollado en los últimos años por el grupo de investigación en el que se han realizado los trabajos que han concluido en la presentación y defensa de esta Tesis Doctoral¹²⁻¹⁴.

IV.2.2. RESULTADOS: DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA Y DETECCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

IV.2.2.1. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN

Los procesos y características que rigen las separaciones electroforéticas descritos anteriormente, indican cuáles son los parámetros experimentales más importantes a la hora de desarrollar un método de análisis empleando esta técnica. La naturaleza de la disolución tampón elegida para la separación cobra especial importancia al influir decisivamente en la magnitud de la movilidad electroosmótica y electroforética y, por lo tanto, en la velocidad de migración neta de los analitos. Por ello, los primeros estudios llevados a cabo en este trabajo se han orientado hacia la optimización de las condiciones adecuadas de pH, concentración y naturaleza de la disolución tampón de trabajo, así como la presencia de sustancias orgánicas que puedan modificar la viscosidad y otras características de la misma. En el primer punto se ha realizado un estudio del comportamiento de los analitos a diferentes valores de pH empezando por la identificación de los tiempos de migración y el orden de elución de los mismos. Para este primer estudio se ha empleado la detección UV fijando una longitud de onda de 280 nm y una columna capilar de 75 μm de diámetro interno y 60 cm de longitud. A la longitud de onda elegida correspondiente a 280 nm todos los compuestos analizados presentan absorción de radiación debida a transiciones electrónicas en los orbitales de los anillos bencénicos sustituidos presentes en estas moléculas y de esta manera se facilita la identificación de los compuestos e interpretación de los resultados. Por otro lado, la detección electroquímica permite el trabajo utilizando capilares de diámetro más reducido, y por ello se ha repetido el estudio de pH y concentración de disolución tampón tomando como partida las condiciones inicialmente elegidas y adecuándolas a las posibilidades que ofrece trabajar con este tipo de columnas.

La metodología desarrollada permite la separación electroforética del ácido cafeico, gálico, ferúlico y *p*-cumárico, cuyas estructuras se muestran en las figuras 14 y 21 del punto IV.1.2, y del ácido sinápico, y los compuestos *t*-resveratrol, (+)-catequina y quercetina, que tienen las estructuras que se muestran en la figura 45:

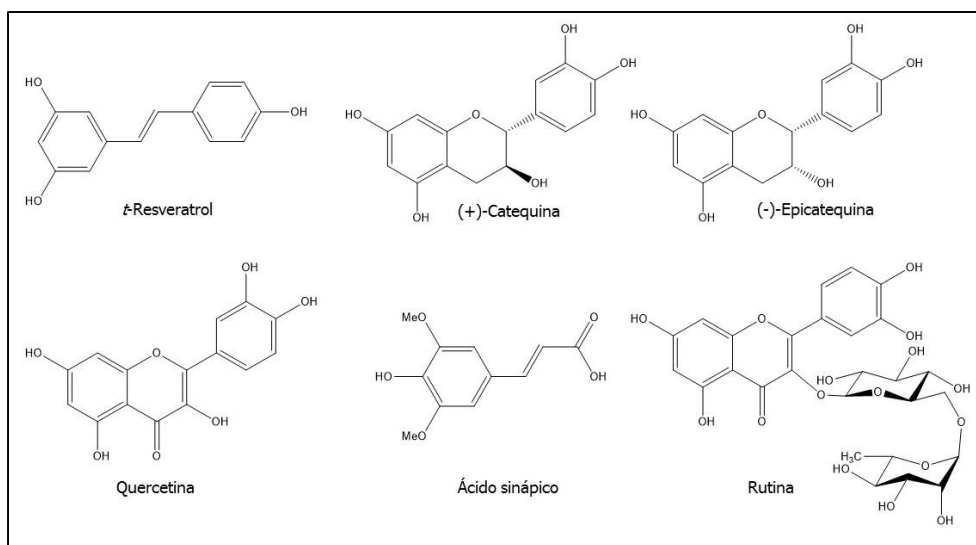


Figura 45. Estructura de los polifenoles

IV.2.2.1.1. Estudio del pH y concentración de la disolución reguladora

Los polifenoles y ácidos fenólicos presentan diferente grado de ionización en función del pH del medio en el que se encuentren, presentando una o varias cargas negativas cuando se encuentran en un medio básico o muy básico, respectivamente. En la tabla 21 se recogen los valores de los pK_a de las moléculas estudiadas. En el caso de los compuestos *t*-resveratrol, (+)-catequina, (-)-epicatequina y quercetina, los valores de pK_a corresponden a las sucesivas desprotonaciones de los grupos hidroxilo de estas moléculas. En el caso de los ácidos fenólicos, pK_{a1} corresponde a la pérdida del protón del grupo carboxílico mientras que pK_{a2} corresponde a la pérdida del protón de uno de los grupos hidroxilo unido al anillo bencénico (grupo fenol) y pK_{a3} es la pérdida del protón del segundo grupo hidroxilo unido al anillo bencénico que presentan los ácidos cafeico y gálico. Este último tendría un valor más de pK_a puesto que en su estructura presenta tres grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático.

Tabla 21. Valores de pK_a para los polifenoles estudiados

Compuesto	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	Referencia
<i>t</i> -resveratrol	9,30	10,0	10,6	15
(+)-catequina	8,70	9,70	11,5	16,17
(-)-epicatequina	8,91	9,93	11,7	16
Rutina	7,35	8,80	-	18
Ácido sinápico	4,53	9,21	-	19
Ácido <i>p</i> -cumárico	4,90	9,35	-	20
Ácido cafeico	4,38	8,58	11,50	21
Ácido gálico	4,26	8,69	11,45	22
Ácido ferúlico	4,60	8,70	-	16
Quercetina	6,70	9,00	-	16

A pH ácido, inferior a 4,30 todos los analitos se encuentran en su forma neutra y no es posible llevar a cabo su separación electroforética mediante electroforesis capilar en zona porque todos se moverían a la velocidad del flujo electroosmótico. A valores de pH entre 7,00 y 8,50 cabe esperar que los analitos presenten una carga negativa y sea el tamaño de las moléculas el que determine el orden de migración. Sin embargo, y puesto que para varios de los compuestos el tamaño es bastante parecido, es probable que la separación en este intervalo de pH no sea efectiva. A partir de pH 8,50, la ionización de las moléculas es diferente en función de los valores que presentan los pK_a de cada una, así como del número de protones que pueda perder la molécula. Es de esperar por tanto, que las mejores separaciones se obtengan a valores de pH superiores a 8,50.

En base a estos conceptos teóricos, se han realizado estudios de separación electroforética de los ácidos fenólicos y la (+)-catequina empleando diferentes disoluciones tampón con valores de pH comprendidos entre 7,00 y 10,00:

- Disolución tampón de fosfato 0,02 M a pH 7,20; 7,50 y 7,70.

- Disolución tampón de borato 0,10 M a pH 8,00; 8,50; 9,20 y 9,60.

Las muestras patrón que sean utilizado en estos estudios contenían una mezcla de los polifenoles en concentración $1,00 \times 10^{-4}$ M de cada uno de ellos, siendo preparadas por dilución con agua ultrapura de los volúmenes apropiados de sus disoluciones madre respectivas.

Las condiciones empleadas en la separación se resumen en la tabla 22:

Tabla 22. Condiciones de trabajo empleadas en el estudio del pH de separación

Condiciones de trabajo	
Introducción en modo hidrodinámico	Presión = 0,5 psi
Longitud de la columna	60 cm
Diámetro de la columna	75 μ m
Voltaje de separación	15,0 kV
Longitud de onda de detección	280 nm

En la figura 46 se muestra la representación del tiempo de migración para cada uno de los analitos estudiados en función del pH empleado en la separación.

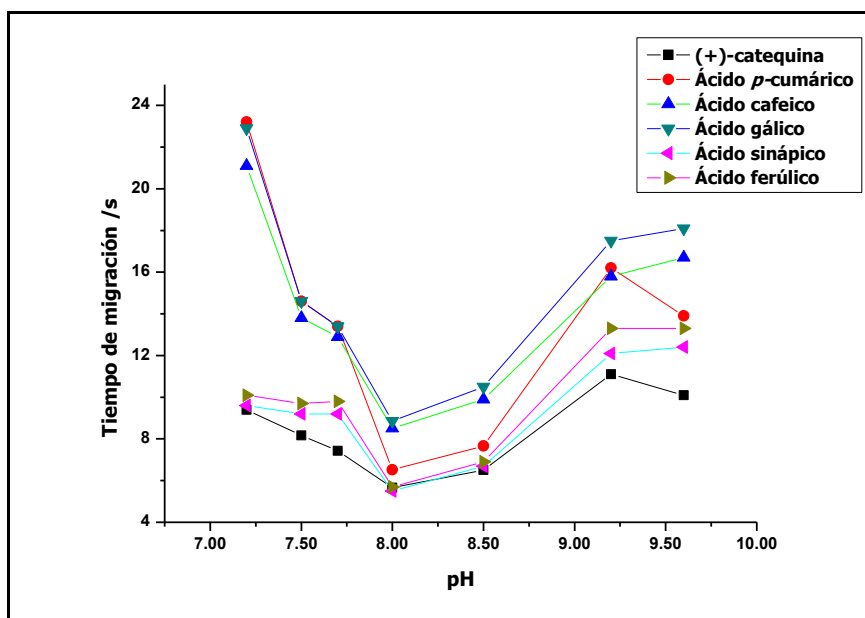


Figura 46. Variación de los tiempos de migración de los analitos con diferentes valores de pH de la disolución tampón borato empleada como medio de separación

En primer lugar puede apreciarse que los tiempos de migración disminuyen con el aumento del pH en el intervalo comprendido entre 7,00 y 8,00. Mientras se emplea tampón fosfato en este intervalo, la disminución de los tiempos de migración está relacionada con el aumento del flujo electroosmótico al incrementar el pH mientras que la movilidad electroforética de los polifenoles, cuyo sentido es opuesto al flujo, no aumenta en la misma medida. Esto es especialmente notorio en el caso de los ácidos gálico, cafeico y *p*-cumárico, lo cual incide a su

vez en la limitada resolución observada. Al emplear tampón borato a pH superior a 8,00 se observa un cambio en la tendencia, incrementando los tiempos de migración al aumentar el pH. En este intervalo de pH el flujo electroosmótico ya no puede aumentar tanto dado que las paredes del capilar presentan su máxima desprotonación y la fuerza iónica del tampón va creciendo con el pH. Simultáneamente, en estas condiciones comienzan a desprotonarse los grupos hidroxilo de los polifenoles y adquieren mayor carga efectiva negativa. Por ello aumenta su movilidad electroforética, de sentido opuesto al flujo electroosmótico, resultando por ello en la disminución de sus tiempos de migración. Dado que el grado de desprotonación de cada compuesto es diferente, sus movilidades electroforéticas tienden a ser diferentes, resultando en movilidades netas que favorecen claramente la resolución en la separación. En vista de que la separación de los compuestos es más favorable en disolución tampón borato a pH 9,60, se utilizará en posteriores estudios.

A continuación se ha estudiado la influencia de la concentración de la disolución tampón de separación la cual está relacionada directamente con la fuerza iónica del medio. La fuerza iónica juega un papel muy importante en las movilidades electroforética y electroosmótica según la expresión de la ecuación 29 propuesta por Wieme²³:

$$\mu_{ep} ; \mu_{eo} \propto \frac{3 \times 10^{-8} Z}{\eta \sqrt{I}}$$

Ecuación 29. Relación de la movilidad electroforética y electroosmótica con la concentración de disolución tampón

En donde Z es la carga efectiva del ion, η la viscosidad del medio e I la fuerza iónica de la disolución tampón. Según la expresión, se deduce que las dos movilidades son inversamente proporcionales a la raíz cuadrada de la fuerza iónica y, por lo tanto, a la raíz cuadrada de la concentración de electrolito. En consecuencia, al aumentar dicha concentración, la fuerza iónica del medio es superior y con ella la movilidad de los analitos disminuiría.

Para estudiar la concentración de disolución tampón se han realizado las separaciones de una mezcla de (+)-catequina y los ácidos *p*-cumárico, cafeico y gálico, estudiando el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,01 M y 0,15 M de tampón borato de pH 9,60, cuyos resultados se muestran en la figura 47:

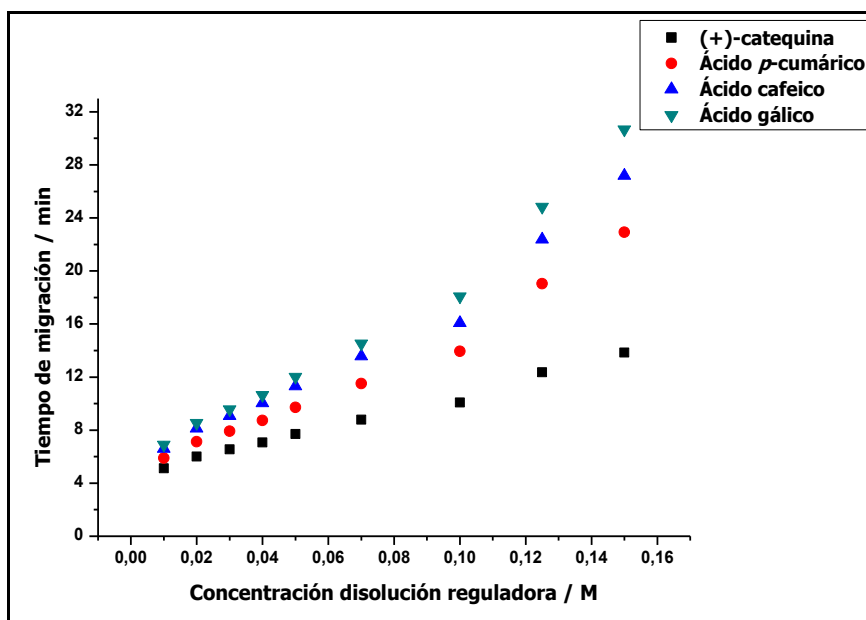


Figura 47. Variación en los tiempos de migración de los analitos a diferentes concentraciones de disolución tampón borato a pH 9,60

El aumento en la concentración de tampón da lugar a un aumento en los tiempos de migración de los analitos así como una disminución en la anchura de las señales, lo cual se traduce en un aumento de la resolución entre picos. Esta se hace especialmente elevada cuando se trabaja a concentraciones superiores a la inicialmente empleada de 0,10 M, tal y como se muestra en los valores de la tabla 23 para la resolución entre el ácido *p*-cumárico y los compuestos anterior ((+)-catequina) y posterior (ácido cafeico) a él, en la separación electroforética.

Tabla 23. Resoluciones entre el ácido *p*-cumárico y los compuestos que migran antes ((+)-catequina) y después (cafeico) de él.

Concentración / M	Resolución (+)-catequina y <i>p</i> -cumárico	Resolución <i>p</i> -cumárico y cafeico
0,10	9,1	4,5
0,12	14,7	6,3
0,15	16,8	6,9

Sin embargo, la corriente de separación aumenta al aumentar la concentración de tampón, haciéndose demasiado elevada cuando se trabaja a concentraciones superiores a 0,10 M. Además, cuando se emplean concentraciones superiores a ésta se obtienen tiempos de análisis excesivamente altos. Estos resultados han llevado a la decisión de continuar el estudio empleando una disolución tampón de borato 0,10 M a pH 9,60 con el objetivo de elegir unas condiciones que cumplan el compromiso entre una buena separación en un tiempo de trabajo no muy elevado. En la figura 48 se muestra el electroferograma obtenido bajo estas condiciones.

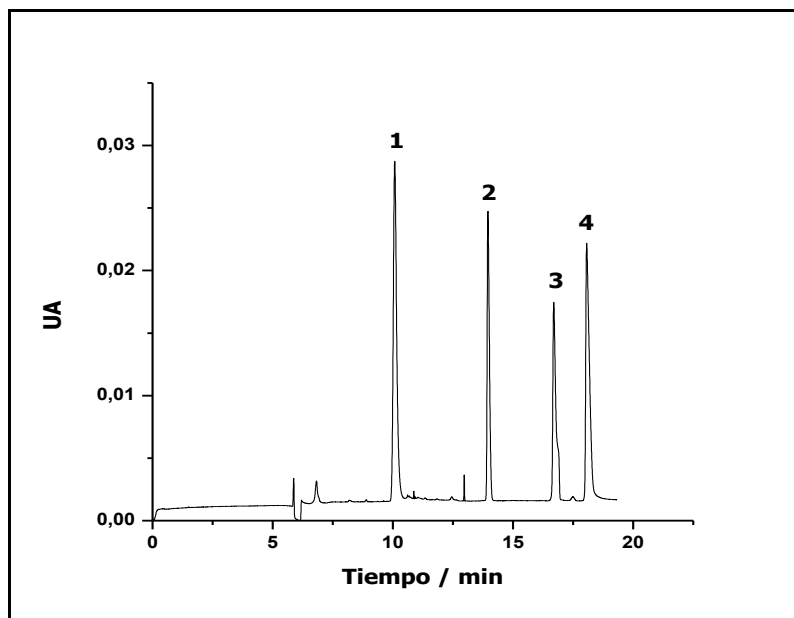


Figura 48. Separación de una mezcla de (+)-catequina (1) y los ácidos p-cumárico (2), cafeico (3) y gálico (4) a pH 9,60 y fuerza iónica 0,10 M

El objetivo final del desarrollo de esta metodología es su aplicación al análisis de vinos (en especial vino blanco), y por tanto se ha llevado a cabo la separación de una muestra de vino blanco, sin tratamiento previo, con la disolución tampón elegida. El resultado se muestra en el electroferograma de la figura 49.

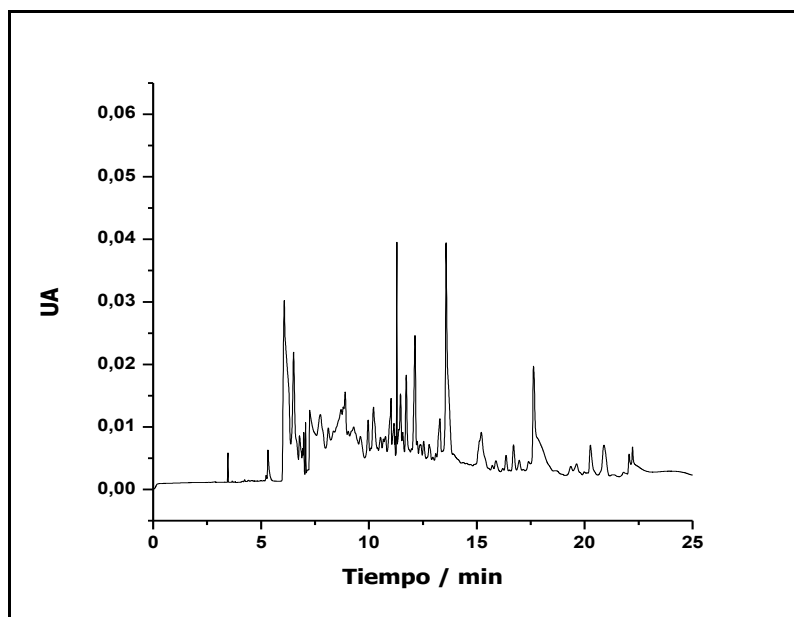


Figura 49. Separación de una muestra de vino blanco empleando tampón borato 0,10 M a pH 9,60

En el electroferograma es posible distinguir entre dos zonas de separación. En una zona inicial, aproximadamente hasta el minuto 13, es posible observar un elevado número de señales sin resolver y que se corresponde con la presencia de compuestos neutros y compuestos con poca carga negativa. A partir de este tiempo, se obtienen señales resueltas correspondientes a compuestos que presentan mayor carga negativa en su estructura.

IV.2.2.1.2. Estudio del tiempo de introducción de muestra

La cantidad de muestra introducida en el sistema de electroforesis así como el modo en que se realiza pueden afectar decisivamente tanto a la eficacia y resolución de la separación como al número de compuestos detectables y la sensibilidad con que pueden detectarse. Dado que la puesta a punto de la separación de polifenoles se enfoca al análisis posterior de muestras de vino, se ha optado por emplear exclusivamente la introducción de muestra hidrodinámica por presión, ya que este modo no altera la composición de la muestra al introducirse en el capilar y, además, generalmente presenta una mayor reproducibilidad que el modo electrocinético. Por tanto se ha estudiado la influencia del tiempo de aplicación de presión para la introducción de muestra en la señal de los analitos, ya que está directamente relacionado con el volumen de muestra que entra en el sistema.

A partir de este punto del trabajo se ha utilizado la detección amperométrica para el seguimiento de las separaciones mediante el acoplamiento de una celda electroquímica al equipo de electroforesis. La detección electroquímica requiere y permite el uso de capilares de menor tamaño que los utilizados con detección UV por lo que algunas condiciones de trabajo (presión aplicada en la introducción de muestra y voltaje de separación) son diferentes. Para iniciar el estudio se ha utilizado el mismo tampón de separación anterior, adaptando varios parámetros instrumentales de separación y detección, habiendo tomado como referencia aquellos empleados en trabajos anteriores realizados en el grupo de investigación¹⁴ y resumidos en la tabla 24:

Tabla 24. Condiciones de trabajo empleadas en el estudio del tiempo de introducción de muestra

Condiciones de trabajo	
Introducción en modo hidrodinámico	Presión = 1,5 psi
Diámetro de la columna	25 μm
Longitud de la columna	55 cm
Voltaje de separación	25,0 kV
Electrodo de trabajo	GCE (1 mm diámetro)
Potencial de detección	0,600 V

Los tiempos de aplicación de presión en la etapa de introducción de muestra evaluados en este estudio fueron 20, 30 y 40 s, los cuales corresponden a 3,7 nL, 5,6 nL y 7,5 nL de muestra, respectivamente (volúmenes calculados empleando la ecuación de Poiseuille, ecuación 28). Los electroferogramas correspondientes a estas separaciones mostraron un aumento en la altura (corriente) y el área de los picos de los analitos al incrementar el volumen de muestra introducido en el capilar. Para tiempos de introducción demasiado elevados, este aumento de área provoca un ensanchamiento de señal excesivo que afecta negativamente a la resolución

de la separación. Por tanto, se ha decidido continuar el trabajo con un tiempo de 30 segundos de aplicación de presión para la introducción de un volumen de 5,6 nL de muestra en el interior de la columna capilar. Con esta condición se cumple el compromiso de una mayor señal y una resolución adecuada para el seguimiento y cuantificación de los analitos objeto de estudio. En la figura 50 se muestra la separación obtenida en estas condiciones de una mezcla de polifenoles que contiene (+)-catequina y los ácidos sinápico, ferúlico, *p*-cumárico y cafeico en concentración $1,00 \times 10^{-4}$ M. En ella se aprecia la presencia de señales bien definidas de los polifenoles mostrando una resolución comparable a la observada mediante detección UV en la figura 48 (téngase en cuenta las diferencias en las condiciones instrumentales).

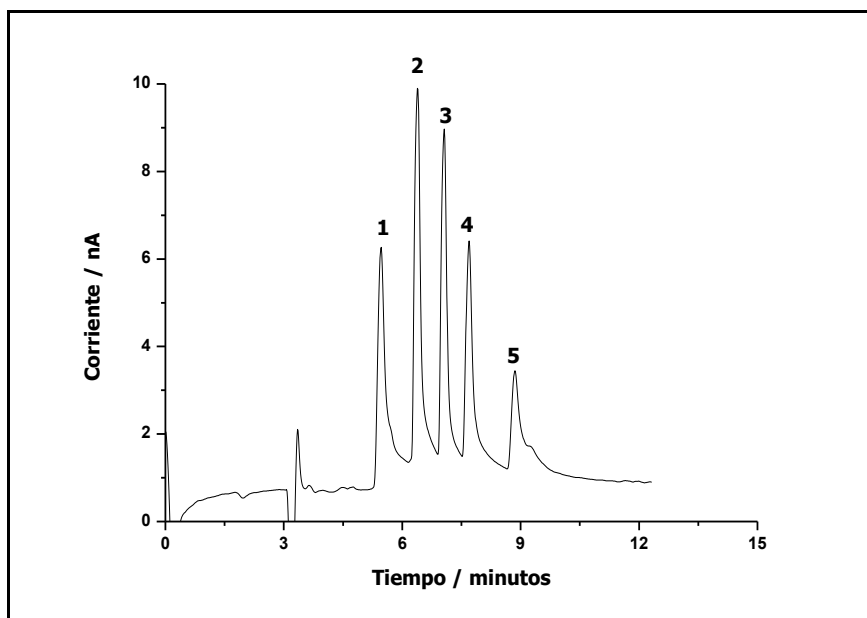


Figura 50. Separación con detección amperométrica de (+)-catequina (1) y los ácidos sinápico (2), ferúlico (3), *p*-cumárico (4) y cafeico (5) empleando tampón borato 0,10 M a pH 9,60

IV.2.2.1.3. Estudio de la concentración de la disolución tampón

Dado que la incorporación del detector electroquímico al sistema de electroforesis capilar implica el uso de capilares con diámetros internos inferiores a los utilizados previamente para la detección UV, se estimó conveniente volver a evaluar la influencia de la concentración de la disolución tampón de separación. La disminución del diámetro interno del capilar da lugar a una mayor facilidad para la disipación del calor generado por el efecto Joule al aplicar el voltaje de separación, por lo que sería posible emplear tampones de separación con mayor fuerza iónica. Además, la fuerza iónica juega un papel muy importante en la calidad de la señal obtenida con detectores electroquímicos. Por ello se ha estudiado un intervalo más amplio de concentraciones de tampón borato de pH 9,60, con el objetivo de comprobar si concentraciones más elevadas pueden mejorar la resolución de la separación sin dar lugar a tiempos excesivos de análisis, ni perjudicar a la sensibilidad y estabilidad de la señal amperométrica.

El estudio se ha realizado siguiendo la evolución de la separación de una mezcla de los ácidos fenólicos sinápico, ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y gálico y de la (+)-catequina al variar la concentración de borato en un intervalo comprendido entre 0,050 M y 0,20 M. El resto de condiciones experimentales han sido las mismas que para el apartado anterior.

En la figura 51 se ha representado la variación del tiempo de migración correspondiente a cada analito en función de la concentración de disolución empleada en cada caso.

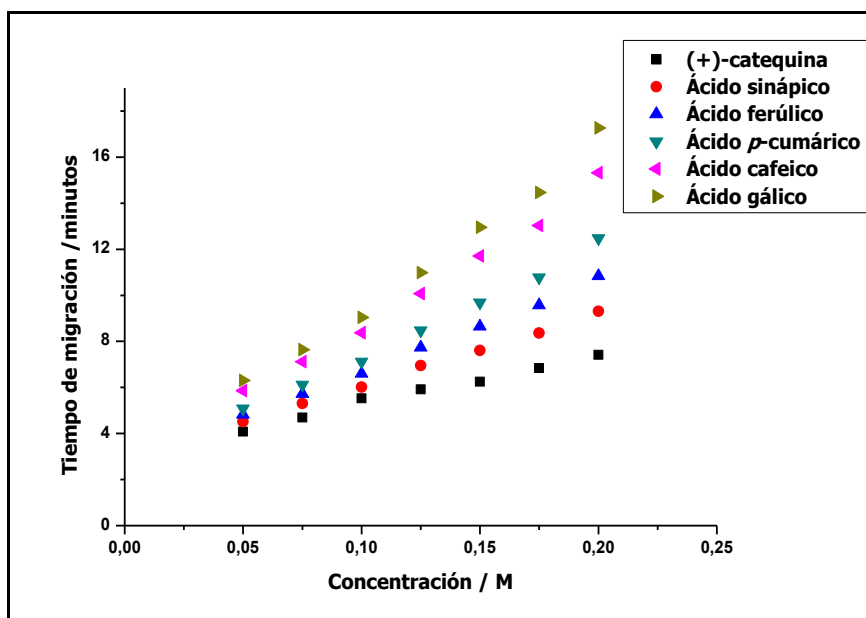


Figura 51. Representación del tiempo de migración de los analitos en función de la concentración de disolución reguladora

Los tiempos de migración de los analitos aumentan con la concentración de la disolución tampón ya que la movilidad neta de la especie es inversamente proporcional a la concentración de la misma. Sin embargo, la separación mejora notablemente con dicho aumento de concentración, obteniéndose una buena resolución en un tiempo relativamente corto de análisis empleando tampón borato de 0,20 M y pH 9,60. En la figura 52 se muestran los electroferogramas obtenidos al realizar la separación con los tampones de concentración más baja y más alta del intervalo estudiado:

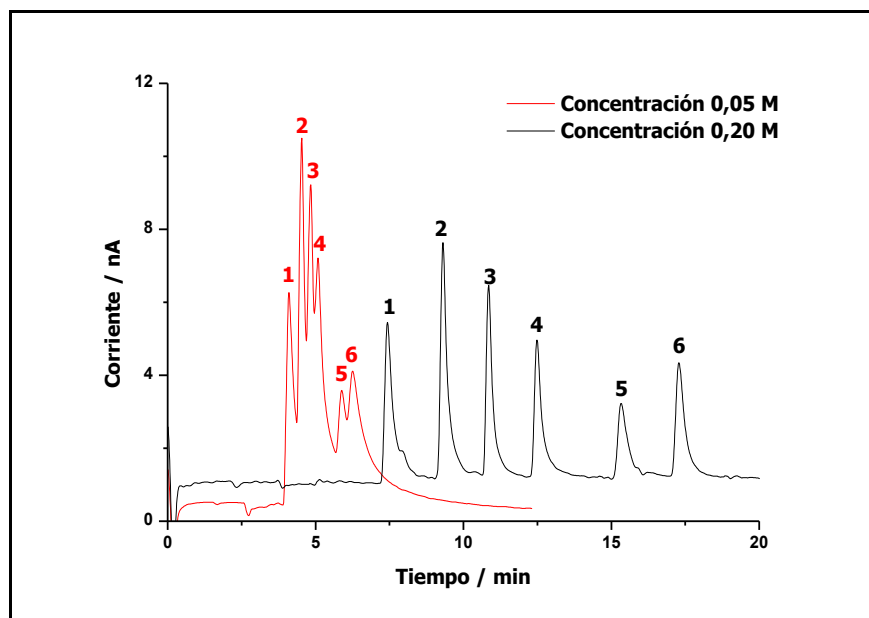


Figura 52. Separación de (+)-catequina (1) y los ácidos sinápico (2), ferúlico (3), p-cumárico (4), cafeico (5) y gálico (6)

El aumento en la concentración de tampón origina una corriente de separación superior debido a la mayor dificultad para disipar el calor por el efecto Joule, explicado en el Apartado IV.2.1.1.4, y esto da lugar a un aumento de la línea base. Sin embargo, puede apreciarse la mejora ostensible en la resolución de la separación con el aumento de la concentración de tampón de separación sin una pérdida reseñable en la sensibilidad de las señales (nótese que las alturas de pico son similares) a pesar del aumento en los tiempos de migración y, por tanto, la menor velocidad neta de los analitos al llegar a la zona de detección.

Así, se ha tomado la disolución tampón de borato a pH 9,60 y concentración 0,20 M como disolución tampón del medio para la separación de los polifenoles.

IV.2.2.1.4. Estudio de la presencia de modificadores orgánicos

La presencia de sustancias orgánicas en el medio de separación puede variar las propiedades fisicoquímicas de la disolución tampón y afectar a la movilidad neta de las especies presentes en la muestra. En general es difícil predecir qué va a ocurrir con la adición de modificadores orgánicos, pudiendo producir alguno(s) de los siguientes efectos²⁴:

- Cambios en la viscosidad.
- Disminución del potencial zeta generado en la doble capa como consecuencia, bien de la variación del pH del medio debido a los cambios que pueden producirse en los valores de los pK_a de los ácidos empleados en la preparación de la disolución tampón, bien por el incremento del valor del pK_a de los grupos silanol de las paredes del capilar o por modificaciones de la constante dieléctrica del medio.
- Modificaciones en el tamaño (solvatación) y carga efectiva de los analitos por alteración en sus pK_a .
- Modificaciones en la solubilidad de los analitos en el medio.

Teniendo en cuenta que el objetivo final de esta Tesis es la aplicación del método al análisis de vinos, la presencia de un modificador orgánico en el tampón de separación podría suponer un incremento aún mayor en la resolución observada hasta el momento. Esto sería deseable ya que este tipo de muestras presentan muchos compuestos fenólicos de diferente naturaleza, además de los aquí estudiados, que probablemente produzcan respuesta en las condiciones empleadas. De este modo se podría minimizar el solapamiento de las señales con otros posibles picos de compuestos sin identificar. Por todo ello se han comprobado los efectos producidos en la separación y detección electroquímica de polifenoles al incluir alcoholes alifáticos de cadena corta en diferente concentración en el medio de separación. Para estos experimentos la separación correspondió a una mezcla de (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, y los ácidos sinápico, ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y gálico de concentración $1,00 \times 10^{-4}$ M.

Inicialmente se estudiaron las separaciones empleando como tampón de separación borato de concentración 0,20 M a pH 9,60 conteniendo un 10% (v/v) de metanol etanol y butanol manteniendo el resto de condiciones experimentales que en el apartado anterior. Los electroferogramas obtenidos se muestran en las figuras 53, 54 y 55 respectivamente.

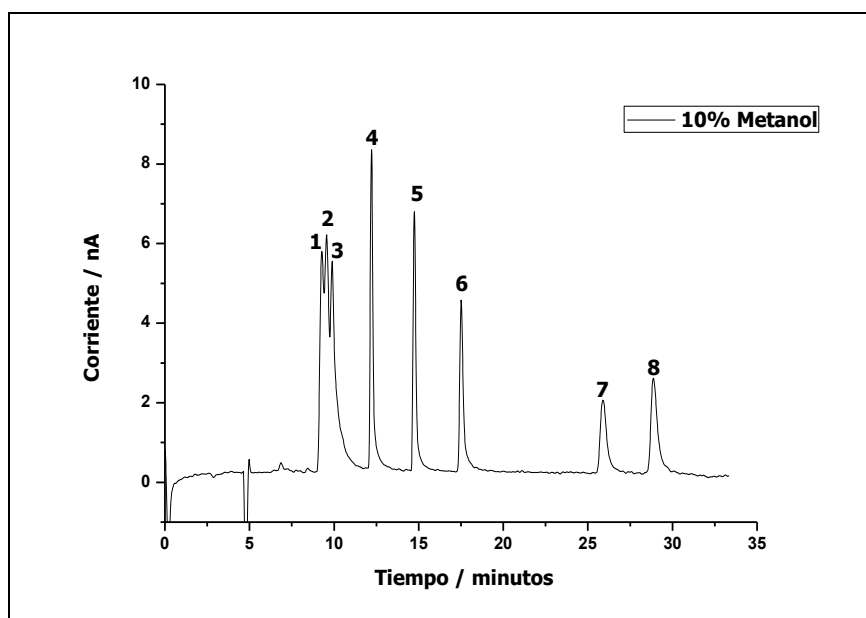


Figura 53. Separación de (+)-catequina (1), epicatequina (2), rutina (3) y los ácidos sinápico (4), ferúlico (5), *p*-cumárico (6), cafeico (7) y gálico (8) con EtOH en el medio de separación

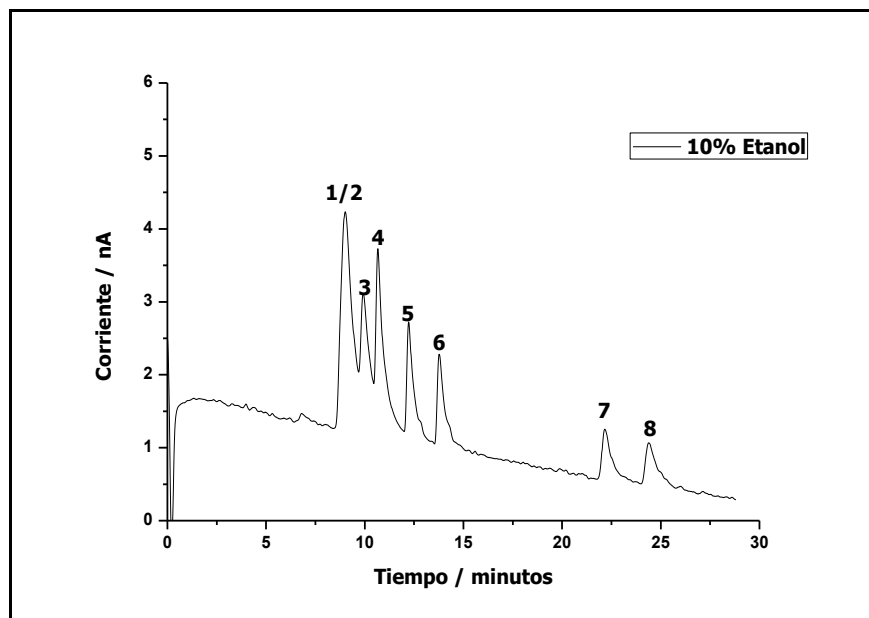


Figura 54. Separación de (+)-catequina (1), epicatequina (2), rutina (3) y los ácidos sinápico (4), ferúlico (5), p-cumárico (6), cafeico (7) y gálico (8) con EtOH en el medio de separación

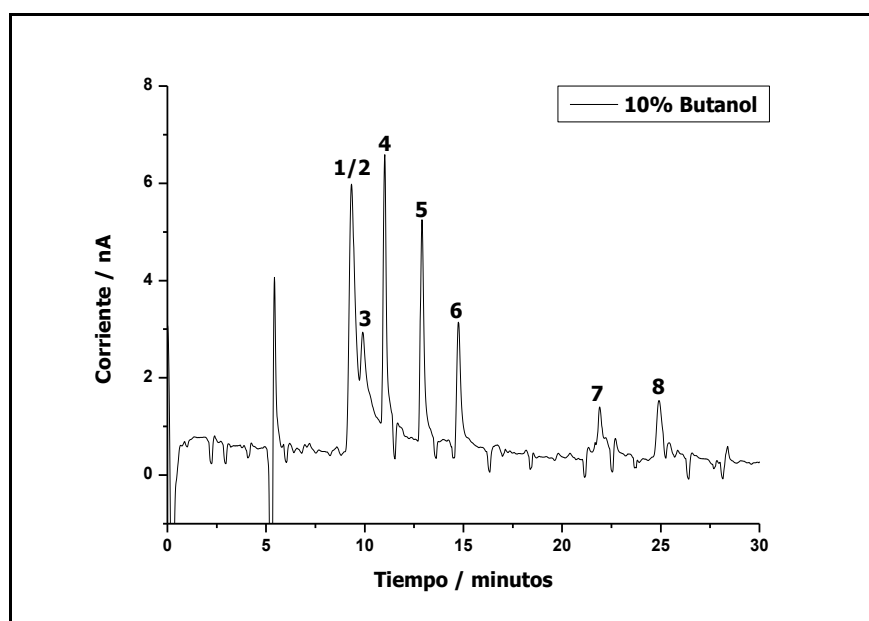


Figura 55. Separación de (+)-catequina (1), epicatequina (2), rutina (3) y los ácidos sinápico (4), ferúlico (5), p-cumárico (6), cafeico (7) y gálico (8) con BuOH en el medio de separación

Los resultados obtenidos indican que la presencia del modificador orgánico incrementa los tiempos de migración (comparar con la figura 52) aumentando también la separación entre los picos. En todos los casos las corrientes de separación disminuyen, observándose una menor anchura de los picos, probablemente debida a una menor dispersión en las bandas de los

analitos al generarse menor calor en el medio de separación. El metanol es el modificador que permite separar mejor los compuestos que presentan mayor similitud en su estructura y por tanto en su relación carga/tamaño, como son los ácidos sináptico, ferúlico y *p*-cumárico. La (+)-catequina y (-)-epicatequina son dos isómeros y esto hace que su separación sea especialmente complicada en todos los casos. Por su parte, la presencia de etanol y butanol da lugar a un empeoramiento de la resolución y en la respuesta electroquímica, siendo este último efecto más notorio en el caso del butanol.

En vista de que la presencia de metanol supone una mejora evidente en la resolución de la separación sin perjuicio aparente en la señal electroquímica, se procedió a evaluar el porcentaje de modificador en la disolución tampón de separación, variando la concentración entre 5% y 15% (v/v). Los electroferogramas obtenidos para las diferentes concentraciones de metanol se muestran en la figura 56.

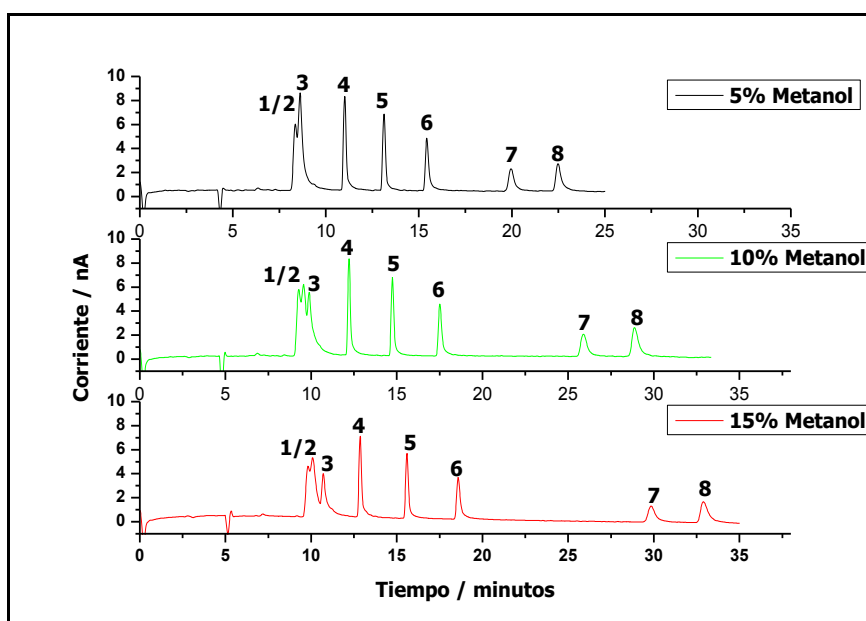


Figura 56. Separación de (+)-catequina (1), epicatequina (2), rutina (3) y los ácidos sináptico (4), ferúlico (5), *p*-cumárico (6), caféico (7) y gálico (8) con MeOH en el medio de separación

Los electroferogramas muestran que al aumentar la cantidad de metanol se incrementan los tiempos de migración, alargándose el tiempo necesario para completar el análisis, al disminuir la movilidad electroosmótica. También se observa un ensanchamiento de picos, más notorio en el caso de los ácidos caféico y gálico, que supone una disminución de la altura de los picos por encima de un 10% (v/v) de metanol. Por lo tanto se optó por emplear un 10% (v/v) de metanol como modificador orgánico del tampón de separación ya que se obtienen electroferogramas con picos bien resueltos en un tiempo no demasiado elevado conservando la sensibilidad inicial en las señales.

Para finalizar estos estudios se consideró verificar el pH de la separación ya que la adición de un compuesto orgánico al medio de separación produce cambios en el pH original. Por lo tanto se evaluó el pH del tampón de separación en el intervalo entre 9,20 y 9,80 mediante el seguimiento de la separación de una mezcla similar a la anterior en la cual se ha añadido

quercetina en la misma concentración. Los resultados obtenidos han mostrado una leve mejoría en la eficacia y resolución de la separación (especialmente entre ácido *p*-cumárico y quercetina) empleando una disolución tampón de pH 9,40, probablemente debida al cambio en las condiciones físico-químicas de la misma. Por lo tanto se ha continuado el desarrollo del método electroforético con esta pequeña variación en el pH del medio de separación. En la figura 57 se muestra el electroferograma de la mezcla de polifenoles obtenido con las condiciones elegidas.

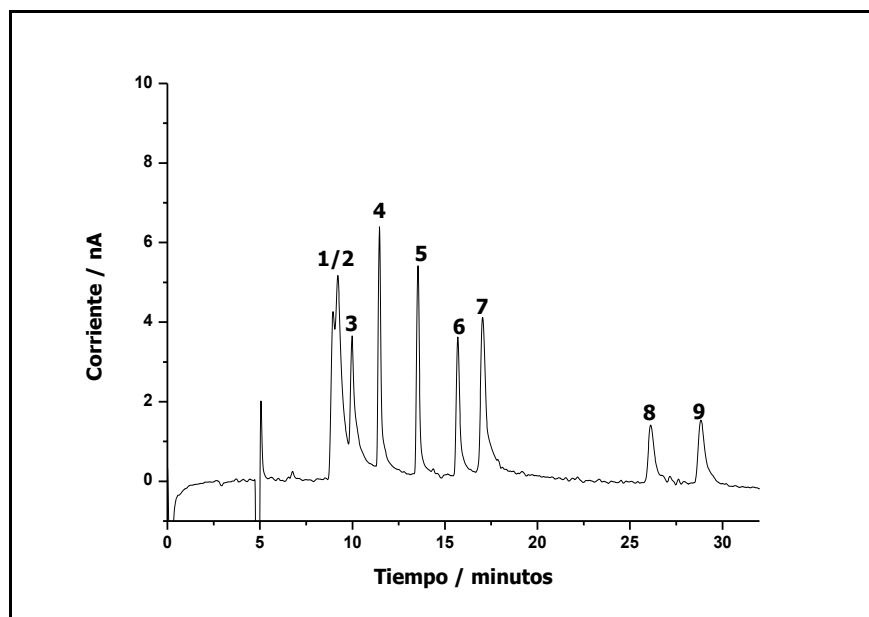


Figura 57. Separación de (+)-catequina (1), (-)-epicatequina (2), rutina (3), ácido sinápico (4), ácido ferúlico (5), ácido *p*-cumárico (6), quercetina (7), ácido cafeico (8) y ácido gálico (9) con disolución tampón borato 0,20 M a pH 9,40 y 10% de metanol.

IV.2.2.1.5. Estudio del voltaje de separación

El voltaje empleado en la separación electroforética tiene especial influencia en su eficacia y tiempo de análisis, las cuáles suelen mejorar al aumentar el mismo debido generalmente a un aumento del flujo electroosmótico y la movilidad electroforética. De este hecho se deduce la importancia de trabajar a voltajes elevados. Sin embargo, un aumento en el voltaje implica una generación de mayor potencia y, como consecuencia, un aumento del efecto Joule tal y como se ha explicado en el punto IV.2.1.1.4. Con el aumento de temperatura se reduce la viscosidad de la disolución tampón y aumenta la movilidad de los iones en el medio de separación, lo que puede dar lugar a:

- Ensanchamiento de picos
- Tiempos de migración no reproducibles
- Posibilidad de descomposición y desnaturalización de la muestra
- Posibilidad de que la disolución tampón pueda llegar a hervir y dar lugar a discontinuidad eléctrica en el interior del capilar.

En consecuencia un aumento excesivo del voltaje de separación puede resultar perjudicial para la calidad de la separación y, además, puede llegar a interferir severamente en la señal electroquímica. Por ello, se ha realizado un estudio del voltaje con el objetivo de trabajar a un valor que sea suficiente para obtener una separación eficaz en un tiempo corto de análisis y al cual no se produzca calentamiento excesivo por efecto Joule. Este voltaje máximo viene determinado por la Ley de Ohm²⁵, donde la pérdida de linealidad en la relación entre la corriente de separación y el voltaje aplicado está directamente relacionada con la disminución de la resistencia eléctrica cuando se produce un exceso de calor que no puede ser disipado. Dicha pérdida de linealidad marca el voltaje máximo de trabajo.

Se ha realizado la separación a diferentes voltajes de una mezcla de *t*-resveratrol, (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, quercetina y los ácidos sináptico, ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y gálico, fijando como valor máximo el de 30 kV y manteniendo el resto de condiciones experimentales como en el final del apartado anterior. Los electroferogramas registrados en estas condiciones mostraron un claro descenso del tiempo de migración de los compuestos al aumentar el voltaje de separación. Para comprobar el máximo valor de voltaje en el que se cumple la Ley de Ohm, se han estudiado las corrientes producidas a cada valor de voltaje y el resultado mostró que la linealidad se pierde a un potencial de 28 kV, lo cual indica la producción de exceso de calor en el interior que no puede ser disipado. Como consecuencia de este estudio el voltaje elegido ha sido 27,5 kV, que permite una separación eficaz con un tiempo de análisis relativamente bajo. En la figura 58 se muestra el electroferograma obtenido bajo las condiciones de separación establecidas en este momento, resumidas en la tabla 25, y que serán empleadas en los estudios posteriores.

Tabla 25. Condiciones de separación

Parámetro	Condición
Disolución reguladora	Borato 0,20 M, pH 9,40 y 10% (v/v) de MeOH
Introducción de muestra	Hidrodinámica, 1,5 psi, 30 segundos
Voltaje de separación	27,5 kV
Concentración analitos	$5,00 \times 10^{-5}$ M
Detección	Amperométrica

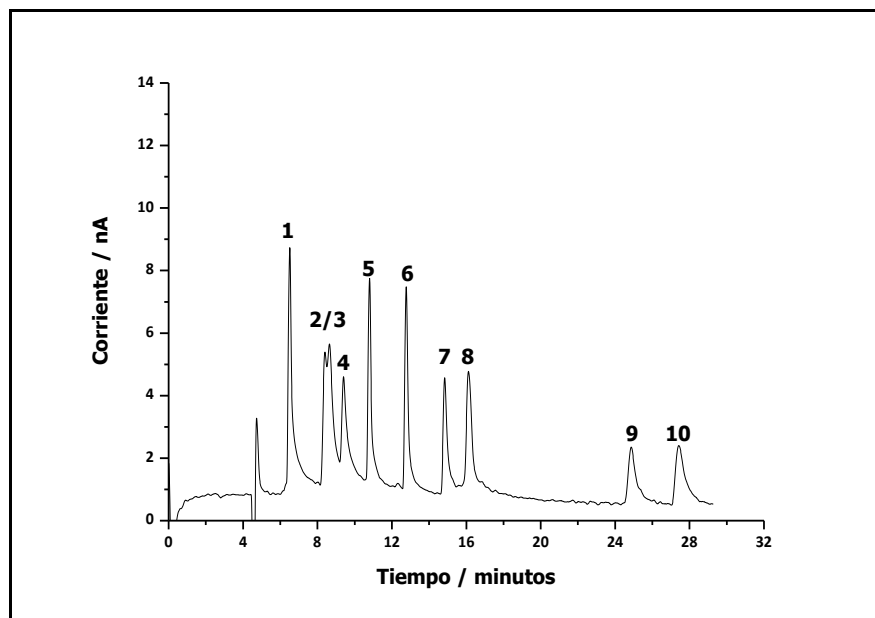


Figura 58. Separación de *t*-resveratrol (1), (+)-catequina (2), (-)-epicatequina (3), rutina (4), ácido sináptico (5), ácido ferúlico (6), ácido *p*-cumárico (7), quercetina (8), ácido cafeico (9) y ácido gálico (10) con las condiciones elegidas

IV.2.2.2. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE DETECCIÓN

Una vez seleccionadas las condiciones de separación, se procedió a examinar el parámetro más importante para la detección amperométrica: el potencial de detección aplicado. De la elección adecuada del potencial de detección depende en gran medida la calidad de la señal obtenida, la cantidad de compuestos detectables y la sensibilidad para cada uno de ellos. Los experimentos llevados a cabo para este fin se basaron en la separación de una mezcla de polifenoles que excluía la (-)-epicatequina y la rutina respecto a la descrita en el apartado anterior. La (-)-epicatequina es isómero de la (+)-catequina y por lo que son muy difíciles de separar en el modo CZE mientras que la rutina es un compuesto muy inestable, que se degrada con mucha facilidad. Ambos casos particulares requieren estudios más detallados que se salen del objetivo inicial de esta Tesis y que se desarrollarán en el laboratorio del grupo de investigación. Como electrodo de trabajo se ha empleado un GCE modificado con una capa de nanotubos de carbono dispersados previamente en PEI, tal y como se describe en el Apartado III.3.1.3, así como un GCE sin modificación previa. Los electroferogramas de la separación de la mezcla de polifenoles fueron registrados fijando valores de potencial de detección que cubren el intervalo entre 0,00 y 1,00 V con incrementos de 0,100 V. Las alturas de pico obtenidas fueron empleadas para confeccionar los voltamperogramas hidrodinámicos correspondientes a cada compuesto. Estos voltamperogramas se exponen en la figura 59, permitiendo comparar las respuestas del GCE sin modificación previa y del GCE modificado.

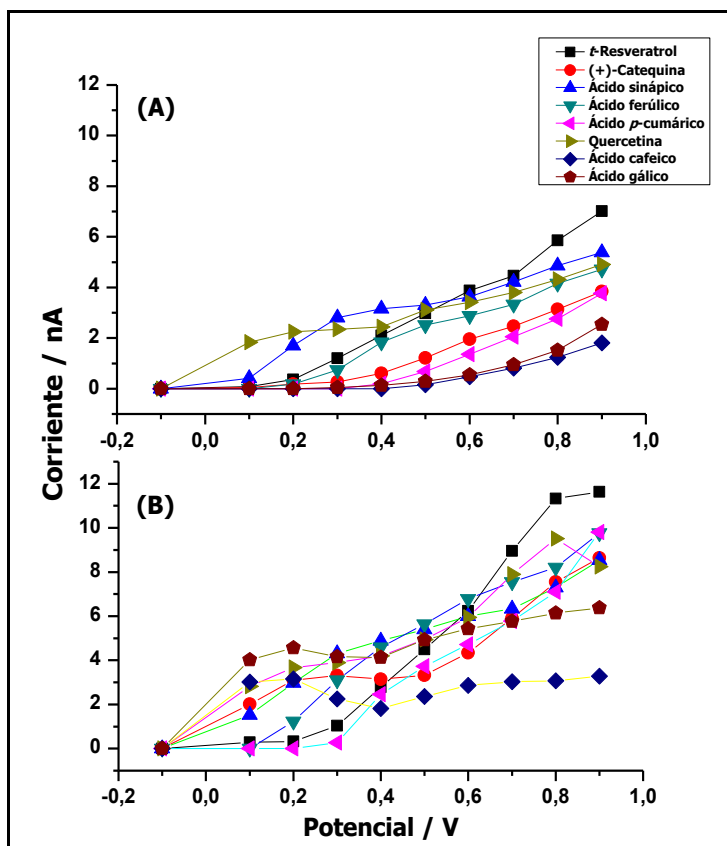


Figura 59. Voltamperogramas hidrodinámicos de la separación electroforética de los polifenoles empleando GCE (A) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (B) como electrodo de trabajo

Los voltamperogramas hidrodinámicos muestran que cuando se emplea el GCE modificado con nanotubos de carbono es posible observar señales de oxidación de todos los polifenoles a potenciales menores respecto al GCE, situación que ya se había indicado en el Apartado IV.1.2. Cuando se trabaja con este electrodo modificado, algunos compuestos presentan señal incluso cuando el potencial de oxidación es cero. Además, para algunos compuestos como quercetina, (+)-catequina, y los ácidos cafeico y gálico se alcanza la zona de estabilidad de señal a valores de potencial más bajos con respecto al GCE. Incluso permitiría detectar todos los polifenoles estudiados seleccionando un potencial de detección de 0,300-0,400 V con sensibilidad cercana a la máxima para la mayoría de ellos. Algo similar podría hacerse con el GCE no modificado solo si se trabaja a potenciales superiores a 0,500 V y siempre con menores sensibilidades. Tal y como se ha explicado anteriormente, la mejora en la respuesta electroquímica al modificar el GCE con la capa de nanotubos está relacionada con su capacidad de facilitar la transferencia electrónica y el aumento en el área efectiva combinada con interacciones electrostáticas favorables entre el material nanoestructurado y los analitos separados.

A la vista de los resultados obtenidos se ha decidido emplear en adelante un potencial de detección de 0,600 V, ya que las señales de los analitos presentan sensibilidades muy cercanas a los valores máximos en todos los casos sin haberse observado un incremento excesivo en la magnitud de la señal de fondo. En la figura 60 se muestra, de modo comparativo, los dos perfiles electroforéticos obtenidos al fijar el potencial de detección seleccionado con los dos electrodos de trabajo empleados.

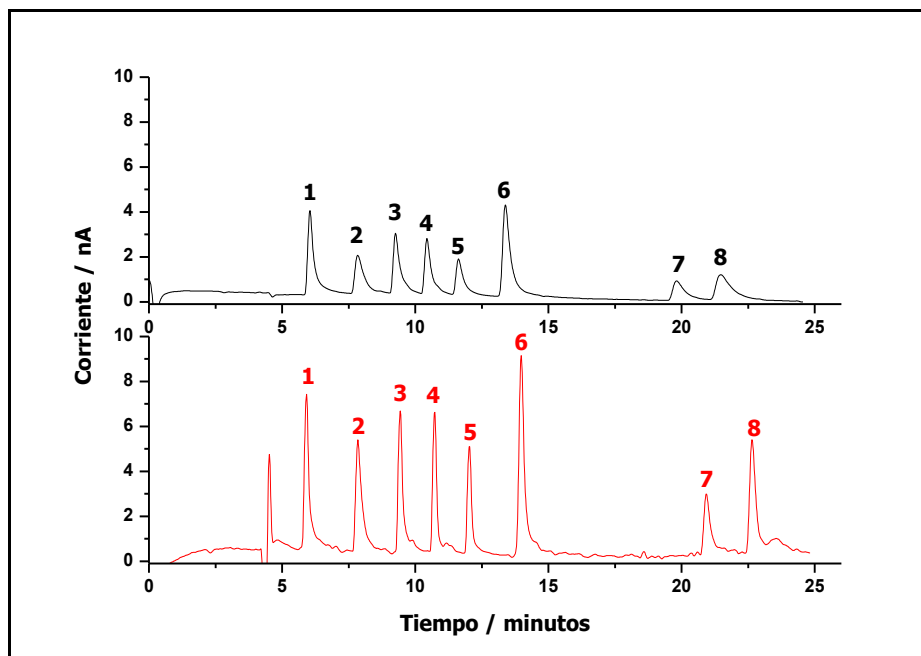


Figura 60. Separación de *t*-resveratrol (1), (+)-catequina (2), ácido sinápico (3), ácido ferúlico (4), ácido *p*-cumárico (5), quercetina (6), ácido cafeico (7) y ácido gálico (8) a un potencial de detección de 0,600 V empleando un GCE (negro) y MWCNT/PEI/(EtOH/H₂O) (rojo)

El electroferograma correspondiente al GCE modificado no solo presenta un claro aumento en las alturas de pico respecto al GCE con niveles de ruido similares en la línea base, sino que hay una disminución en las anchuras de pico lo que mejora la eficacia de la separación ostensiblemente. Este efecto tiene su origen en la mayor facilidad de los nanotubos de carbono para llevar a cabo la reacción electroquímica que genera la señal amperométrica, electrolizando de forma más rápida y efectiva los analitos que alcanzan la superficie del electrodo. Como consecuencia el tiempo de residencia de los analitos ya separados en la zona de detección se minimiza impidiendo la dispersión de la banda, resultando finalmente en picos más estrechos y afilados.

IV.2.2.3. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Se han evaluado las características analíticas del método, obteniendo y estudiando las curvas de calibrado, intervalo lineal, exactitud del método, límites de cuantificación y detección, así como la reproducibilidad y repetitividad en la respuesta analítica del electrodo modificado usado como sensor. Las ventajas en la detección electroquímica de los electrodos modificados con respecto a los electrodos de GCE han sido expuestas en el capítulo anterior, por tanto, los parámetros analíticos sólo han sido estudiados para el electrodo modificado con el cual se ha desarrollado el método de separación y detección.

IV.2.2.3.1. Evolución de la señal con la concentración de polifenoles: intervalo de respuesta lineal

Para el estudio del intervalo lineal se ha llevado a cabo la separación de mezclas de polifenoles, con las condiciones elegidas y a diferentes valores de concentración en el intervalo entre $1,00 \times 10^{-4}$ M y $1,00 \times 10^{-6}$ M para todos ellos. En la tabla 26 se reúnen los datos de las ecuaciones para las curvas de calibrado junto con el intervalo lineal para cada analito.

Según los datos que se reflejan en la tabla 26, se puede concluir que el método presenta una buena sensibilidad, con valores para las pendientes de las curvas de calibrado elevados. Así mismo, la linealidad se cumple en un intervalo amplio de concentraciones, en los que, se encuentran incluidos los valores de polifenoles presentes en vinos recogidos en la bibliografía^{26,-31}.

Tabla 26. Curvas de calibrado, intervalo lineal y coeficientes de regresión de los polifenoles

Analito	Ordenada / nA	Pendiente / nA·μmol ⁻¹ ·L	Coeficiente de regresión (r ²)	Intervalo lineal / μM
t-Resveratrol	0,1±0,1	(10±1)×10 ⁴	0,9986	8-100
(+)-Catequina	0,03±0,09	(8,2±0,9)×10 ⁴	0,9992	9-100
Ácido sinápico	-0,01±0,07	(10,9±0,6)×10 ⁴	0,9996	7-100
Ácido ferúlico	-0,03±0,08	10,9±0,3×10 ⁴	0,9998	7-100
Ácido p-cumárico	0,06±0,1	(8,8±0,4)×10 ⁴	0,9992	9-100
Quercetina	-0,3±0,5	(13±3)×10 ⁴	0,9959	6-50
Ácido cafeico	0,09±0,08	(5,8±0,5)×10 ⁴	0,9989	13-75
Ácido gálico	0,2±0,1	(10,0±0,5)×10 ⁴	0,9973	8-75

IV.2.2.3.2. Evaluación de los límites de detección y cuantificación

Habitualmente, en electroforesis capilar el límite de detección viene definido como la concentración de analito que origina una relación señal/ruido igual a un determinado valor que, por lo general, es 2 o 3.

Para realizar el cálculo del límite de detección se emplea la ecuación 30:

$$C_{LD} = \frac{3N}{S}$$

Ecuación 30. Cálculo del límite de detección

En la cual N es el promedio de la variación de la señal de fondo (ruido) durante un intervalo de tiempo cercano a la posición del pico³², y S la sensibilidad del método.

Análogamente el límite de cuantificación corresponde a la concentración cuya relación señal/ruido es 10, calculándose mediante la misma expresión indicada en la ecuación 30, sustituyendo el 3 por un 10.

Los resultados obtenidos para los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Valores de los límites de detección y cuantificación

Analito	LD / μM	LC / μM
<i>t</i>-Resveratrol	2,5	8,2
(+)-Catequina	2,9	9,6
Ácido sinápico	2,2	7,3
Ácido ferúlico	2,2	7,3
Ácido <i>p</i>-cumárico	2,7	9,1
Quercetina	1,9	6,3
Ácido cafeico	4,1	13,0
Ácido gálico	2,4	8,0

IV.2.2.3.3. Estudio de la exactitud del método

La exactitud del método ha sido evaluada mediante el cálculo de la recuperación analítica. Para ello, se han analizado muestras de vino blanco sin dopar y dopadas con una concentración de $2,50 \times 10^{-5}$ M de cada uno de los analitos. La diferencia en el valor de las señales del vino dopado y sin dopar, y la sustitución del mismo en la curva de calibrado de cada polifenol, determina el valor de concentración recuperada de cada analito y ésta se relaciona directamente con la exactitud del método desarrollado. La media de tres repeticiones del ensayo para el porcentaje de concentración recuperada de cada especie se muestra en la tabla 28, con la desviación estándar de la misma.

Tabla 28. Valores para el porcentaje de recuperación de cada analito

Analito	% Recuperación
<i>t</i>-Resveratrol	70,2 \pm 0,8
(+)-Catequina	83,2 \pm 0,7
Ácido sinápico	81,5 \pm 0,6
Ácido ferúlico	91,3 \pm 0,7
Ácido <i>p</i>-cumárico	96,6 \pm 0,4
Quercetina	88,4 \pm 0,4
Ácido cafeico	91,1 \pm 0,5
Ácido gálico	104,2 \pm 0,2

Los valores descritos en la tabla se corresponden con una elevada exactitud del método por presentar porcentajes de recuperación cercanos al 100 % en la mayoría de los casos. La

recuperación obtenida en el *t*-resveratrol se ve afectada por el solapamiento de su señal con la de otros compuestos presentes en la muestra, lo cual incide negativamente en los valores de concentración cuantificados para este componente.

IV.2.2.3.4. Estudio de la precisión: reproducibilidad, repetitividad

Se han evaluado la precisión del método mediante estudios de la reproducibilidad de la señal entre electrodos y con el mismo electrodo (repetitividad):

Reproducibilidad: se ha medido la señal producida por una mezcla de todos los analitos en concentración $5,00 \times 10^{-5}$ M, con cinco electrodos diferentes y realizando tres repeticiones en cada caso.

Repetitividad: el mismo electrodo se ha empleado para medir la señal producida por la misma mezcla de polifenoles en concentración $5,00 \times 10^{-5}$ M durante seis separaciones electroforéticas consecutivas.

Para la evaluación de precisión se compara el coeficiente de variación de Horwitz³³ (*CV*), relacionado con la concentración de compuesto utilizada tal y como se muestra en la ecuación 31, con el coeficiente de variación obtenido de los análisis de reproducibilidad y repetitividad.

$$(\%CV) = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

Ecuación 31. Coeficiente de variación de Horwitz

En el cual *C* es la concentración expresada en $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$.

El coeficiente de variación calculado del método viene dado por la desviación estándar relativa (%RSD) del valor de las señales obtenidas en cada caso. En la tabla 29 se muestran los valores obtenidos:

Tabla 29. Valores para la reproducibilidad y repetitividad del método expresados en %RSD

Analito	%CV (Horwitz)	Reproducibilidad (%RSD)	Repetitividad (%RSD)
<i>t</i> -Resveratrol	11,1	10,0	2,6
(+)-Catequina	10,7	5,4	3,4
Ácido sinápico	11,1	6,6	1,1
Ácido ferúlico	11,4	3,1	0,7
Ácido <i>p</i> -cumárico	11,6	5,7	3,0
Quercetina	10,6	11,0	8,0
Ácido cafeico	11,5	9,8	1,1
Ácido gálico	11,6	6,6	1,0

Un método se considera preciso cuando el coeficiente de variación obtenido es inferior al coeficiente de variación de Horwitz, por ello se puede concluir que la precisión del método es buena para todos los analitos, excepto para la reproducibilidad entre electrodos en el caso de la quercetina, cuyo valor de RSD es ligeramente superior al coeficiente de variación de Horwitz.

Los valores de RSD obtenidos durante la evaluación de la repetitividad son indicativos de la adecuada estabilidad en las señales amperométricas que se consigue con la integración de los nanotubos de carbono en la superficie transductora. Por otra parte, la fluctuación observada en las señales utilizadas para la estimación de la reproducibilidad no supera niveles recomendables, pudiendo afirmar que el proceso de modificación del GCE y su posterior montaje y alineamiento en la celda de detección no introduce una variabilidad adicional desmesurada.

IV.2.3. BIBLIOGRAFÍA

1. Tesis Doctoral de Arne Tiselius "*The moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins*", A. Tiselius, Nova Acta Regiae Soc. Sci. Ups.; Serv. IV, 7, nº4, 1930.
2. Arne Tiselius, Transactions of the Faraday Society, 33, 524, 1937.
3. R. Virtanen, "*Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection*", Acta Polytechnic Scand, 129, 1-67, 1974.
4. F. E. P. Mykkers, F. M. Everaerts, T. E. P. M. Verheggen, "*High-performance zone electrophoresis*", Journal of Chromatography, 169, 11-20, 1979.
5. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, "*Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries*", Analytical Chemistry, 53, 1298-1302, 1981.
6. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, "*High resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis*", Journal of Chromatography A, 218, 209-216, 1981.
7. J. P. Landers, Ed. "*Handbook of Capillary Electrophoresis*", Capítulo 1, CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, 1994.
8. R. Cela, R. A. Lorenzo y M. C. Casais, "*Técnicas de separación en química analítica*", Capítulo 17, Síntesis, Madrid, 2002.
9. D. Skoog, D. West, F. Holler, S. Crouch, "*Fundamentals of Analytical Chemistry*", Capítulo 9, Brooks/Cole, 2014.
10. I. Canlas, E. Bosch, M. Rosés, "*Prediction of separations of phenols by capillary zone electrophoresis*", Analytica Chimica Acta, 458, 355-366, 2002.
11. K. Swinney, D. J. Bornhop, "*Detection in capillary electrophoresis*", Electrophoresis, 21, 1239-1250, 2001.
12. M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, A. Sánchez, "*Simultaneous UV and electrochemical determination of the herbicide asulam in tap water samples by micellar electrokinetic capillary chromatography*", Analytica Chimica Acta, 469, 243-252, 2002.
13. A. Sánchez Arribas, M. Moreno, E. Bermejo, M. A. Lorenzo, A. Zapardiel, M. Chicharro, "*Design and adaptation of miniaturized electrochemical devices integrating carbon nanotube-based sensors to commercial CE equipment*", Electrophoresis, 30, 3480-3488, 2009.
14. M. Moreno, A. Sánchez Arribas, E. Bermejo, A. Zapardiel, M. Chicharro, "*Analysis of polyphenols in white wines by CZE with amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes*", Electrophoresis, 32, 877-883, 2011.
15. M. Deak, H. Falk, "*On the chemistry of the Resveratrol diastereomers*", Monatshefte für Chemie, 134, 883-888, 2003.
16. N. Kovachev, A. Canals, A. Escarpa, "*Fast and selective microfluidic chips for electrochemical antioxidant sensing in complex samples*", Analytical Chemistry, 82, 2925-2931, 2010.
17. J. M. Herrero-Martínez, M. Sanmartín, M. Rosés, E. Bosch, C. Ràfols, "*Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis*", Electrophoresis, 26, 1886-1895, 2005.
18. C. Mielczarek, "*Acid-base properties of selected flavonoid glycosides*", Journal of Pharmaceutical Sciences, 25, 273-279, 2005.
19. F.Z. Erdemgil, S. Şanlı, N. Şanlı, G. Özkan, J. Barbosa, J. Guiteras, J.L. Beltrán, "*Determination of pK_a values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry*", Talanta, 72, 489-496, 2007.

20. M. Putschögl, P. Zirak, A. Penzkofer, "Absorption and emission behavior of trans-p-coumaric in aqueous solutions and some organic solvents", *Chemical Physics*, 343, 107-120, 2008.
21. F. Borges, J. L. F. C. Lima, I. Pinto, S. Reis, C. Siquet, "Application of a potentiometric system with data-analysis computer programs to the quantification of metal-chelating activity of two natural antioxidants: Caffeic Acid and Ferulic Acid", *Helvetica Chimica Acta*, 86, 3081-3087, 2003.
22. P. Z. Araujo, P. J. Morando, M. A. Blesa, "Interaction of Catechol and Gallic Acid with Titanium dioxide in aqueous suspensions, 1. Equilibrium studies", *Langmuir*, 21, 3470-3474, 2005.
23. R. J. Wieme "Theory of electrophoresis", *Chromatography*, 3rd Edition, 228-281, 1975.
24. Y. Yang, R.I. Boysen, T.W. Hearn, "Impact of organic solvents on the resolution of synthetic peptides by capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, 1043, 81-89, 2004.
25. R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, "Capillary Electrophoresis: Principles and Practice", Capítulos 3, 4, Springer-Verlag, 1993.
26. R. S Jackson, "Wine Science. Principles and Applications" 3rd Edition, Elsevier, Amsterdam, Holanda, Capítulo 6, 2008.
27. U. Fisher, in: R. G Berger (Ed), "Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability", Springer, Berlín, 241-267, 2007.
28. S. Preys, G. Mazwrolles, P. Corcoux, A. Samson, U. Fisher, M. Hanafi, D. Bertrand, V. Cheynier, "Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses", *Analytica Chimica Acta*, 563, 126-136, 2006.
29. K. Chira, N. Pacella, M. Jourdes, P. L. Teissedre, "Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age", *Food Chemistry*, 126, 1971-1977, 2011.
30. C. C. Udenigwe, V. R. Ramprasath, R. E. Aluko, P. J. H. Jones, "Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy", *Nutrition Review*, 66, 445-454, 2008.
31. G. F. Ferrazzano, I. Amati, A. Ingenito, A. Zarrelli, G. Pinto, A. Pollio, "Plant polyphenols and their anti-carcinogenic properties: A review", *Molecules*, 16, 1486-1507, 2011.
32. R. Compañó Beltrán, AngelRios Castro, "Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos", Capítulo 11, Síntesis, Madrid, 2002.
33. R. Wood, "How to validate analytical methods", *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 624-632, 1999.

**IV.3. CLASIFICACIÓN DE VINOS
BLANCOS ESPAÑOLES A PARTIR DEL
ÍNDICE ELECTROQUÍMICO Y PERFIL
ELECTROFORÉTICO. APLICACIÓN DE
TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS**

IV.3.1. INTRODUCCIÓN: TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

IV.3.1.1. INTRODUCCIÓN A LA QUIMIOMETRÍA

La quimiometría fue introducida como disciplina por primera vez en 1975 por *The Chemometrics Society*, que la definió como “*la disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos*”¹. Más adelante, en el año 1997, D.L. Massart la definiría como “*la disciplina química que utiliza la matemática, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos, y obtener conocimiento a partir de sistemas químicos*”². En el año 2001, Siebert la definió como “*la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos así como de los principios de la buena ciencia de la medida para extraer de forma eficiente información útil de datos químicos*”³.

La gran cantidad de información química que se puede obtener actualmente de una muestra debido a la automatización y versatilidad de los procesos de medida en los laboratorios, ha hecho necesario el desarrollo de un conjunto de métodos matemáticos y estadísticos que permitan el “filtrado” de dicha información. Así, para una misma muestra, con la aplicación de las diferentes técnicas quimiométricas, es posible determinar cuál es la información relevante de todos los datos obtenidos en el análisis dando lugar a una mejora en el rendimiento del proceso analítico y calidad de los resultados.

En la figura 61 se muestra un esquema del proceso analítico⁴ a seguir en el análisis de una muestra, desde el planteamiento del problema, análisis de la misma y toma de decisiones a partir de los resultados obtenidos.

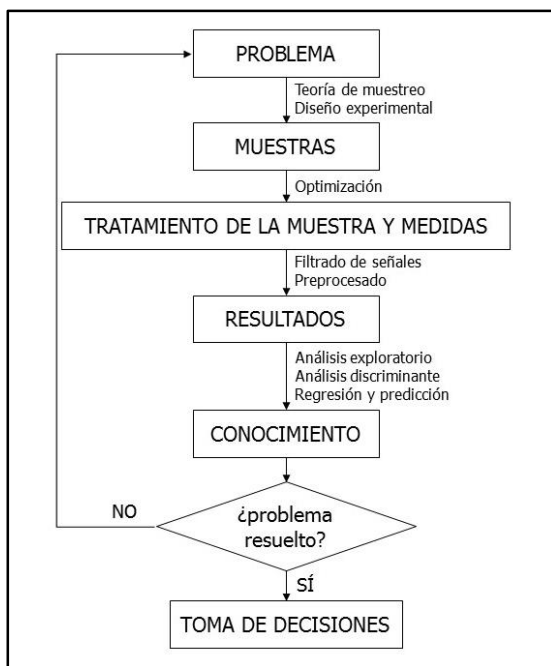


Figura 61. Esquema de un proceso analítico

En la figura 61 se refleja la implicación de la quimiometría en todas las etapas del análisis de una muestra problema. Así, la aplicación de técnicas quimiométricas al muestreo y al diseño del proceso, permite obtener unos resultados de calidad con poco trabajo experimental. Una vez obtenidos dichos datos, su tratamiento con técnicas estadísticas facilita la interpretación de los mismos. Por tanto, se podría afirmar que se aportan dos ventajas:

- Creación y diseño de experimentos eficaces.
- Potenciación de la incorporación del químico a la cadena de control del proceso productivo.

Esta disciplina ha sido introducida en todos los campos de interés científico, tales como diseño molecular, química ambiental, química clínica, medicina, geoquímica y química de los alimentos entre otros.

Desde hace unos años el interés en la aplicación del control de calidad en el sector alimentario ha cobrado una elevada relevancia. La detección de adulteraciones o fraudes, pertenencia a cierta denominación de origen, control de contaminantes y residuos, control de aditivos o el estudio del efecto de los métodos de conservación son aspectos que preocupan a la autoridades competentes, que trabajan con el objetivo principal de beneficiar a los consumidores y garantizar la calidad de los productos.

La gran cantidad de parámetros que pueden definir a una muestra de origen alimentario⁵ hace necesario el empleo de técnicas matemático-estadísticas con el objetivo de simplificar la información obtenida en el análisis y facilitar su interpretación. Así, el número de variables a tener en cuenta en una clasificación, o en la pertenencia a un grupo, se ve reducido cuando se aplica un análisis de componentes principales. Matemáticamente, eliminar o reducir el número de variables es proyectar el espacio original (n -dimensional) en un espacio m -dimensional, donde m es menor que n .

En términos generales, para el tratamiento estadístico de una gran cantidad de datos correspondientes a diferentes parámetros químicos (variables) obtenidos a partir del proceso de análisis de muestra(s) sencillas(s) o grupos de muestras, primero debe hacerse una exploración de los datos. Las técnicas de exploración de datos ponen de manifiesto estructuras ocultas en la matriz de datos y se emplean para resaltar la información contenida en ella. Una forma sencilla es la representación de los datos tomando las variables de dos en dos, si bien es más útil la representación proyectándolos sobre planos oblicuos definidos por combinaciones lineales de las variables. Después, se pueden realizar estudios de reducción de variables para facilitar la posterior creación de modelos de clasificación o calibración multivariada, con el objetivo de agrupar muestras en función de sus características o estudiar determinados aspectos de las mismas, como por ejemplo la concentración de determinada especie sin necesidad de llevar a cabo tratamientos de muestra con el objetivo de identificar y obtener la información analítica de interés.

IV.3.1.2. EXPLORACIÓN DE DATOS

IV.3.1.2.1. Técnicas de preprocesado: escalado

Previo a la realización de tratamientos estadísticos, en ocasiones se hace necesario un preprocesado de la matriz de datos. Este procedimiento se emplea en situaciones en las que existe falta de información para alguna muestra en alguna variable o simplemente existen datos anómalos así como cuando se obtienen datos que difieren mucho en las magnitudes. Con el preprocesado se transforman los datos con el objetivo de evitar errores que puedan dar lugar a conclusiones erróneas. Así, técnicas de preprocesado⁶ son, por ejemplo:

- Relleno de huecos.
- Cambio de escala o escalado.
- Centrado o traslación del origen de coordenadas al centroide.

La primera técnica se emplea cuando existen huecos en la matriz de datos. Para el relleno del hueco se puede sustituirlo por la media de la variable o por la media de la categoría a la que pertenece el objeto o bien sustituirlo por un valor al azar acotado dentro de los límites de la variable o de la categoría a la que pertenece el objeto.

El escalado de los datos es la técnica más empleada en el preprocesado, puesto que la normalización de los mismos evita errores debidos a diferencias en el tamaño o escala en que se encuentren. En principio, se supone que todas las variables presentan igual influencia sobre los resultados del análisis quimiométrico (estadístico), por lo que el escalado es imprescindible cuando existen en la matriz de datos diferentes escalas que pueden proceder por ejemplo de la concentración de elementos traza y mayoritarios en un mismo análisis o de la presencia de señales débiles frente a otras que son mayores. Para la normalización se puede emplear el escalado por rango o el autoescalado.

En el escalado por rango, el cálculo de cada dato de la matriz, Z_{iw} , se realiza mediante la expresión mostrada en la ecuación 32:

$$Z_{iw} = \frac{X_{iw} - \min(X_{iw})}{\max(X_{iw}) - \min(X_{iw})}$$

Ecuación 32. Escalado por rango

En donde $\min(X_{iw})$ es valor mínimo y $\max(X_{iw})$ el máximo. En el escalado por rango se obtienen variables cuyo valor mínimo es cero y máximo la unidad.

El autoescalado es el centrado o traslación del origen de coordenadas al centroide. El cálculo del valor normalizado, Z_{iw} , para cada dato se realiza empleando la ecuación 33:

$$Z_{iw} = \frac{X_{iw} - \bar{X}_w}{S_w}$$

Ecuación 33. Autoescalado

En donde X_{iw} el valor que presenta en la matriz de datos, \bar{X}_w la media y S_w la desviación estándar de los datos. Con este procedimiento se obtienen datos cuya media es cero y la

desviación estándar es igual a la unidad. Lo que se hace en el autoescalado es un centrado por columnas, en las que cada columna se corresponde con los valores de las variables, y como consecuencia de ello el origen de coordenadas queda situado en el centroide de la nube de datos. De esta manera se distribuye simétricamente alrededor de su centro de gravedad y la expansión es la misma en cualquier dirección del espacio, independientemente de los valores de las variables.

IV.3.1.2.2. Técnicas de aprendizaje no supervisado: Análisis de clúster

El Análisis de clúster⁷ es una técnica que agrupa una serie de objetos (datos) en unas clases determinadas de manera que los objetos similares se encuentren en la misma clase. Se trata de una técnica de clasificación no supervisada que aporta una primera idea de la existencia de similitudes entre muestras en función de las variables introducidas, que puede indicar relaciones y/o agrupamientos latentes entre ellas. Los grupos no se conocen antes de realizar el análisis matemático y no existe ninguna suposición acerca de la distribución de las variables. El análisis de clúster busca objetos próximos en el espacio de las variables. Esta proximidad se mide con la distancia entre objetos. Para hacer el cálculo de las distancias se utilizan diferentes expresiones, siendo las habitualmente elegidas las que se definen en la tabla 30:

Tabla 30. Cálculo de la distancia entre objetos

Distancia	Cálculo matemático
Euclídea	$d_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^T (x_i - x_j)} = \sqrt{\sum_{k=1}^n (x_{ik} - x_{jk})^2}$
Manhattan	$d_{ij} = \sum_{k=1}^n x_{ik} - x_{jk} $
Minkowski	$d_{ij} = \left[\sum_{k=1}^n x_{ik} - x_{jk} ^m \right]^{1/m}$

En las expresiones descritas en la tabla 30, las "x" corresponden a objetos. De todas ellas, la más utilizada es la distancia Euclídea, cuya interpretación geométrica toma la forma que se muestra en la figura 62.

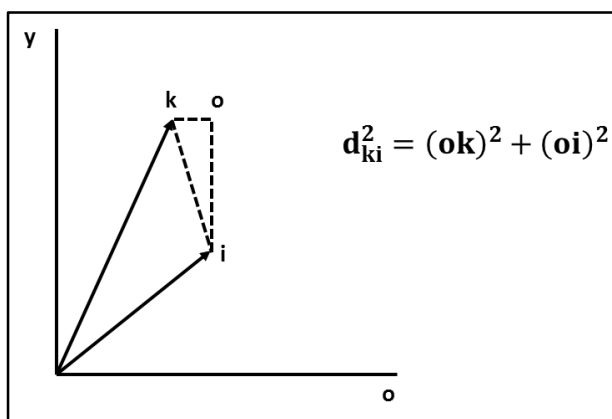


Figura 62. Representación geométrica del cálculo de la distancia de Euclides

Una vez elegido el tipo de distancia a emplear, se debe decidir el modelo de aglomeración, es decir, cómo se van a realizar los agrupamientos. Para ello se pueden utilizar diferentes métodos:

- **Enlace simple:** la distancia entre dos clúster es la menor distancia existente entre los dos elementos más cercanos de cada uno de ellos.
- **Enlace completo:** la distancia entre dos clúster es la mayor distancia que hay entre los dos elementos más lejanos de cada uno de ellos.
- **Enlace promedio:** cuando dos elementos o clúster han sido unidos, la distancia entre éste y el nuevo elemento o clúster, es la distancia promedio de la distancia que existe entre cada uno de los elementos del primer clúster y el/los elementos del tercero.
- **Método del centroide:** agrupamiento en función de los centroides (punto medio) de los clúster, de menor a mayor valor de distancia entre los mismos.
- **Método de Ward:** el criterio de agrupamiento se define después de realizar el modelo. Se evalúan las posibles combinaciones de clúster que se pueden producir y se elige aquella que minimiza la heterogeneidad, definiéndose como la suma de las distancias al cuadrado de cada elemento con respecto al centroide.

Para representar gráficamente las similitudes de muestras se emplea un dendrograma, es decir, un esquema en el cual los objetos se agrupan jerárquicamente de acuerdo a sus proximidades (definidas como similitud). El dendrograma se construye uniendo los puntos, correspondientes a las distancias entre objetos, uno a uno empezando por los más próximos. Estos forman el primer grupo, representado por un único punto que sustituye a los que lo componen. El dendrograma se ha finalizado cuando todos los puntos se han unido y comparten un tronco común.

El eje vertical del dendrograma puede mostrar la distancia entre dos puntos i, j (d_{ij}) o la similitud, s_{ij} , dada por la expresión de la ecuación 34:

$$s_{ij} = 100 \left(1 - \frac{d_{ij}}{d_{max}} \right)$$

Ecuación 34. Similitud entre dos objetos

IV.3.1.3. TÉCNICAS DE REDUCCIÓN DE LA DIMENSIONALIDAD: ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

En el proceso de recogida de datos sobre una muestra es común el empleo de un elevado número de variables, especialmente cuando no se tiene mucha información sobre dicha muestra. El problema principal que se produce es la dificultad en la visualización de los datos, haciéndose prácticamente imposible distinguir el conjunto de características que definen una muestra y la relacionan o diferencian de las demás. Además, es probable que algunas de estas variables estén fuertemente correlacionadas y aporten la misma información, pudiendo acortarse el experimento, el tratamiento de datos y la toma de decisiones, cuando se conocen las variables redundantes o irrelevantes.

Esto se resume en reducir el número de variables haciendo una proyección del espacio n -dimensional en un nuevo espacio m -dimensional donde $m < n$. Lo más importante es realizar esta reducción del espacio con la pérdida de la menor información posible.

El análisis de componentes principales (PCA)⁸ es una técnica empleada para realizar dicha reducción de la dimensionalidad cuando existe correlación entre variables y por tanto no es aplicable cuando esta correlación no se produce. En un análisis de este tipo se generan unos nuevos ejes denominados componentes o factores principales, que vienen dados por combinaciones lineales de las variables originales. Estos son ortogonales entre sí y representan las direcciones de máxima variabilidad de los datos.

Matemáticamente, el cálculo de los componentes principales (Z_1, Z_2, \dots, Z_n) significa obtener las combinaciones lineales de las variables X_1, X_2, \dots, X_n , tal que:

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1n}X_n$$

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + \dots + a_{2n}X_n$$

$$Z_n = a_{n1}X_1 + a_{n2}X_2 + \dots + a_{nn}X_n$$

De esta manera se obtienen tantos factores principales como variables estén presentes en el problema. Los coeficientes a_{nn} se eligen de forma que dichos factores no presenten correlación entre sí. Para la elección del primer componente principal, se tomará aquel que represente la dirección de máxima varianza de los datos, el segundo recoge la siguiente mayor parte de la varianza y así sucesivamente. Cuando la correlación entre las variables originales es muy significativa, el número de componentes principales a emplear en la representación de los datos es menor y por tanto el espacio se ha reducido.

Es evidente que este método es sensible a la escala de los datos. Por ello, es importante decidir primero si se va a trabajar con los datos originales o es necesario hacer un escalado de los mismos, con el objetivo de evitar que una variable pueda tomar mayor peso en el análisis del que realmente tiene por tener una escala mayor que las demás.

Los componentes principales son los "autovectores" o vectores propios de la matriz de correlación, la técnica para calcularlos se denomina "análisis propio". A cada componente principal le corresponde un "autovalor" que proporciona la cantidad de varianza en el conjunto de datos que se explica por dicho componente. Para datos estandarizados cada variable original tiene una desviación estándar y una varianza de 1. Así, la varianza total del conjunto de datos y la suma de los "autovalores" son ambos igual al número de variables.

Una vez obtenidas las combinaciones lineales de los factores y elegido el número de ellos a emplear en la representación de los datos, para una muestra dada, la sustitución del valor de cada variable original en la combinación lineal de cada componente principal da lugar a unas nuevas coordenadas en el nuevo espacio, conocidas como "*puntuaciones*". Las muestras representadas con dichas "*puntuaciones*" se conocen como "*Scores*". Por norma general, en esta nueva representación es posible la identificación de grupos de objetos, la cual es difícil de reconocer en la matriz original de los datos. Principalmente es una técnica de reducción de datos y por tanto éste en ocasiones no se cumple. A veces, además, los componentes principales tienen una interpretación física, permitiendo conocer qué variables experimentales están directamente implicadas en la agrupación de las muestras y cuáles no es necesario tener en cuenta y por tanto podría evitarse su medida experimental.

IV.3.1.4. TÉCNICAS DE RECONOCIMIENTO DE MODELOS SUPERVISADAS

Este conjunto de técnicas permite construir modelos capaces de asignar la pertenencia de un nuevo objeto a una categoría dada, según sus características y en base al modelo creado. Para ello, es necesario emplear la información aportada por un conjunto de muestras de las cuales se conoce la pertenencia a un grupo o categoría dada, denominado "grupo de aprendizaje o entrenamiento", que además contiene muestras que representan la variabilidad total del conjunto. Así la matriz de datos contiene, al menos, una variable categórica a la que pertenece cada objeto y que constituye la respuesta o variable que se quiere predecir, y una o más variables que describen características de los objetos, empleadas como variables predictoras. Una vez construido el modelo se requiere un grupo de prueba o también denominado grupo de validación para comprobar la efectividad de su clasificación. Este grupo de prueba está formado por un conjunto de muestras de las que también se conoce su pertenencia a una clase determinada. De esta manera es posible evaluar la clasificación de muestras que hará el modelo con un conjunto de objetos de origen desconocido.

Existen diferentes métodos para realizar esta evaluación⁹ y la forma de hacerlo debe ser seleccionada antes de la construcción del modelo. Así, se emplean:

- **Grupo de evaluación sencillo:** los objetos se separan aleatoriamente en grupos de entrenamiento y evaluación. Dependiendo del tamaño total, el grupo de evaluación está formado por un número de muestras que componen entre el 5 y 50% del total y el modelo se calcula sólo una vez. Por ello, el tiempo de cálculo es muy reducido, pero también es un proceso poco fiable ya que la capacidad predictiva depende de la selección aleatoria y de la proporción de objetos que entran en cada grupo.
- **Leave-one-out:** todas las muestras del grupo de aprendizaje excepto una se utilizan para construir la función discriminante de clasificación. La que queda fuera constituye el grupo de evaluación. El proceso se repite tantas veces como muestras se tengan dejando fuera una diferente de cada vez. De esta forma, todas las muestras han formado el grupo de evaluación una vez.
- **Validación cruzada (cross validation):** es un proceso parecido al anterior pero en él, el grupo de evaluación está constituido por un pequeño grupo de muestras aleatorio del total. El proceso se repite las veces que sea necesario hasta que todas constituyan

el grupo de evaluación una vez, es decir, si se emplea el 50% de las muestras se repite dos veces, si se utiliza el 25% cuatro veces, el 20% cinco y así sucesivamente.

- **Grupo de evaluación repetido:** calcula el modelo muchas veces, creando cada vez un nuevo grupo de evaluación por selección aleatoria de un cierto número de objetos de la tabla. El número de objetos elegidos cada vez no tiene por qué ser el mismo, es decir, un objeto puede entrar muchas veces en grupos de evaluación diferentes, acompañado por otros, que no tienen por qué ser siempre los mismos ni en mismo número. Con este método se obtienen los resultados más robustos pero el tiempo de cálculo es el más elevado.

Las técnicas clasificatorias trabajan a diferentes niveles:

- **Nivel 1:** todos los objetos han sido asignados correctamente a las diferentes categorías.
- **Nivel 2:** es posible reconocer clases imprevistas dentro del grupo de aprendizaje y algunas de las muestras de dicho grupo se han asignado incorrectamente.
- **Nivel 3:** además de las propiedades del nivel 2, pueden predecir una propiedad externa.
- **Nivel 4:** además de lo anterior, predicen más de una propiedad externa.

Existen diferentes tipos de técnicas de reconocimiento de modelos supervisadas, que se pueden clasificar por ejemplo como sigue¹⁰:

Probabilística: técnicas que se basan en estimados de distribuciones de probabilidad. Dentro de ellas se distinguen entre paramétricas y no paramétricas:

Paramétricas: en ellas, las distribuciones de probabilidad vienen descritas por parámetros de localización y dispersión, por ejemplo, media, varianza o covarianza. Dentro de ellas están:

- Técnicas de clasificación: Análisis Lineal Discriminante (LDA), Análisis Discriminante Cuadrático (QDA), Análisis Discriminante Regularizado (RDA).
- Técnicas de modelización: UNEQ (UNEQUAL dispersed classes).

No paramétricas: son métodos de funciones de potencial.

Basadas en distancias: se puede hablar de técnicas basadas en distancias entre objetos o entre objetos y modelos.

Distancias entre objetos:

- Técnicas de clasificación: K Nearest Neighbours, o método de los K vecinos más próximos (KNN)
- Técnicas de modelización: están basadas en la distancia inter-objetos.

Distancias entre objetos y modelos:

- Técnicas de clasificación y modelización: Soft Independent Models of Class Analogy (SIMCA)

Basadas en experiencia:

Técnicas de clasificación: Máquina de aprendizaje lineal (LLM), Máquina de aprendizaje cuadrático (QLM), Redes neuronales artificiales (ANN).

Además para el desarrollo de métodos de calibración multivariante se emplean habitualmente la Regresión PLS (Partial Least Squares o regresión por mínimos cuadrados parciales) y Regresión PCR (regresión en componentes principales).

A continuación se describen más detalladamente algunas de las técnicas nombradas y que se emplean más habitualmente.

IV.3.1.4.1. Análisis Lineal Discriminante (LDA)

El Análisis Lineal Discriminante es una técnica de clasificación propuesta por Fisher¹¹, de tipo probabilística paramétrica, ya que el criterio que emplea es la varianza entre muestras en función de las diferentes variables. Con esta técnica es posible identificar las características que diferencian a dos o más grupos y crear una función capaz de distinguir con la mayor precisión posible a sus miembros. Además, podemos saber qué variables permiten diferenciar a los grupos, y cuántas de ellas son necesarias para obtener una buena clasificación. Por tanto, se trata de una técnica de doble funcionalidad⁸:

- Explica la pertenencia de cada caso a una clase u otra, en función de las variables de su perfil y cuantifica el peso de cada una de ellas en la discriminación.
- Predice a qué grupo más probable deberá pertenecer un nuevo individuo del que únicamente se conoce su perfil de variables.

Matemáticamente, la finalidad del análisis discriminante es encontrar una función lineal discriminante (D) formada por la combinación lineal de las variables X_1, X_2, \dots, X_n , tal que:

$$D = b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n$$

En esta combinación lineal, las medidas originales (n medidas en total) de una muestra se han convertido en una única función transformando el problema n -dimensional en uno unidimensional. Los coeficientes (b) de los términos elegidos son los que diferencian entre grupos lo máximo posible. Por ello, los objetos en el mismo grupo tienen valores similares de D y diferentes a los del resto de grupos.

Como hipótesis inicial se asume que todas las clases presentan distribución normal con la misma dispersión y separadas linealmente. Es decir, existe un plano que separa totalmente una clase de otra o lo que es lo mismo, las coordenadas de ambas clases con respecto a dicho plano tienen signos contrarios. Cuando esta hipótesis no se cumple, se emplea el Análisis Cuadrático Discriminante (QDA), que presenta el mismo fundamento que el LDA pero en el que se obtiene una función cuadrática en lugar de una función lineal.

Trabaja en nivel 1, no es capaz de aceptar la existencia de nuevas categorías. En ella no se aceptan más variables que casos y, por norma general, funciona bien con cinco o menos clases. Además es sensible a la correlación entre variables ya que las funciones utilizadas maximizan la varianza entre categorías y minimizan las varianzas intra-categorías con el objetivo de conseguir una buena clasificación. El cociente entre las varianzas inter-clase e intra-clase se

denomina "cociente de Fisher" y se utiliza para seleccionar el plano de proyección de los objetos. La dirección del espacio que maximiza dicho cociente se denomina "Primera Variable Canónica" y es la dirección del espacio con máximo poder discriminante entre clases.

El modelo se construye con un conjunto de muestras del cual se tiene información de la categoría a la que pertenecen, denominado grupo de entrenamiento. La pertenencia de los objetos a cada clase se emplea como variable dependiente. Los objetos de este grupo se asignan a una categoría dada en función de la información aportada por las variables independientes, de clasificación o, también denominadas discriminantes, añadiendo por tanto a la matriz de datos las variables categóricas necesarias. Así, se construyen las funciones discriminantes de una en una, buscando maximizar el cociente de Fisher mencionado.

El inconveniente se presenta cuando la distribución de datos no es la adecuada, ya que este método da lugar a resultados erróneos cuando las clases no son linealmente separables.

El caso más sencillo que se presenta es aquel en el cual hay dos clases y dos variables X_1 y X_2 . El análisis lineal discriminante trata de buscar la combinación lineal de variables, tal que:

$$D = b_1X_1 + b_2X_2$$

Donde b_1 y b_2 son los coeficientes de las variables X_1 y X_2 respectivamente que consiguen que los objetos de un grupo obtengan puntuaciones máximas en D y mínimas en el otro grupo. La representación de dicha función discriminante es unidimensional.

Los valores para los centroides de cada grupo se obtienen sustituyendo la media de cada uno en dicha función discriminante:

$$\bar{d}_1 = b_1\bar{x}_1^{(1)} + b_2\bar{x}_2^{(1)}$$

$$\bar{d}_2 = b_1\bar{x}_1^{(2)} + b_2\bar{x}_2^{(2)}$$

La función discriminante D , debe cumplir que la distancia entre los centroides sea máxima, esta distancia se representa como:

$$h = \bar{d}_1 - \bar{d}_2$$

donde \bar{d}_1 y \bar{d}_2 son las medias de cada grupo en la función D .

Además, con este análisis se busca reducir la dimensionalidad del problema, utilizando para ello aquella combinación lineal formada por las variables que discriminan entre grupos.

IV.3.1.4.2. Análisis de los K vecinos más próximos (KNN)

Perteneciente al grupo de técnicas de clasificación basadas en distancias entre objetos, KNN es un procedimiento con menos restricciones que LDA. La única hipótesis de partida aquí es asumir la existencia de una métrica global o métricas locales relacionadas con la similitud de los objetos. No hace ninguna suposición sobre la distribución de las variables y se emplea cuando las muestras no pueden ser separadas por un plano¹².

En este procedimiento, para la creación del modelo de clasificación se emplean las distancias a las que se encuentran los objetos del grupo de aprendizaje pertenecientes a las diferentes clases. Una muestra nueva es clasificada en función de su proximidad a las diferentes clases o

categorías, ordenadas en orden creciente de lejanía respecto de la que queremos clasificar. Así, el nuevo objeto se incluye en la categoría a la que pertenecen sus "*K vecinos más próximos*". El número K considerado influye de forma decisiva en el resultado del proceso y siempre debe ser mayor de uno, entero y pequeño. Además, es importante que sea impar para evitar la posibilidad de un "empate" que impida en ocasiones la correcta clasificación.

Presenta una serie de ventajas que lo hacen bastante útil, entre las que caben destacar dos de ellas:

- Un solo modelo permite clasificar nuevos objetos independientemente del número de categorías.
- La calidad de las predicciones es casi independiente de la forma que tengan las categorías.

El mayor inconveniente de este método es que no calcula las probabilidades de pertenencia de un objeto nuevo a cada categoría. Además, no permite la representación gráfica de los resultados.

IV.3.1.4.3. Métodos de funciones de potencial

Este tipo de métodos¹³, también "denominados estimadores de densidad de Kernel" estiman la función de densidad de probabilidad utilizando la densidad local de todos los objetos del grupo de aprendizaje y sin emplear, por ejemplo, parámetros como la media o desviación típica. Se definen regiones de densidad de probabilidad asociadas a cada clase, de manera que la asignación de un nuevo objeto a una clase se dará, además de por evaluación de la distancia mínima a una clase, por la "probabilidad de pertenencia" a la misma.

Así, y como diferencia de los otros dos métodos explicados, este tipo de procedimientos permiten la detección de nuevas clases no previstas inicialmente. Además, detectará un objeto del grupo de aprendizaje mal clasificado, ya que se deformará la función de densidad de probabilidad de la clase correspondiente.

Para hacer el cálculo de las funciones se suman las contribuciones individuales de los objetos en el grupo de aprendizaje. Dichas contribuciones, que de forma genérica se representan como $\phi(x, x_i)$, pueden adoptar diversas formas pero es conveniente que cumplan ciertos requisitos:

- Debe ser máxima cuando $x = x_i$.
- Debe tender a 0 cuando la distancia entre x y x_i tiende a infinito.
- Debe ser una función continua decreciente en x .

Por tanto, es preferible utilizar aproximaciones gaussianas (potencial normal) o triangulares (potencial triangular).

IV.3.1.4.4. Método SIMCA

El método SIMCA¹⁴ es la primera técnica de modelización de clases introducida en química para solventar el problema que se presenta en muchas ocasiones: la existencia de muestras que no pertenecen a ninguna de las clases o categorías establecidas en un principio. Su acrónimo

corresponde a las siglas en inglés *Soft Independent Modeling Class Analogy*, cuyo significado es el siguiente:

SOFT: no presupone hipótesis en cuanto a la distribución de variables, tratándose por tanto de un "método blando".

INDEPENDENT: cada categoría se modeliza de forma independiente.

MODELING: el modelo de cada categoría se basa en los componentes principales de dicha categoría, empleándose los datos tras un autoescalado por separado de cada una de ellas.

CLASS ANALOGY: la técnica tiene por objetivo poner de manifiesto la analogía o diferencia entre las diferentes clases.

La modelización se lleva a cabo mediante un Análisis de Componentes Principales de cada categoría. Así, cada clase está definida por un conjunto de componentes principales separado de las demás y cuyo número se determina mediante una validación cruzada. Tras la realización de dicho análisis, se inspeccionan la proyección de los objetos en los planos formados con el objetivo de verificar posibles "outliers" (objetos mal clasificados) y así eliminarlos de la matriz de datos. El proceso se repite para todas las categorías, dando lugar así a nuevas clases formadas por los objetos extraños. En torno al modelo descriptor de cada clase se construye un volumen o hipervolumen (también llamado hipercaja) de confianza determinado por la distribución de las muestras.

Los nuevos objetos se clasifican en función de las distancias con los centroides de las hipercajas de cada clase, por lo que los resultados están influenciados por el escalado de los datos. Estas hipercajas pueden estar próximas entre sí generando superficies de solapamiento, dando lugar a una clasificación no concluyente si un objeto nuevo cae en dicha región. En la figura 63 se muestra un esquema de representación de las hipercajas de dos clases:

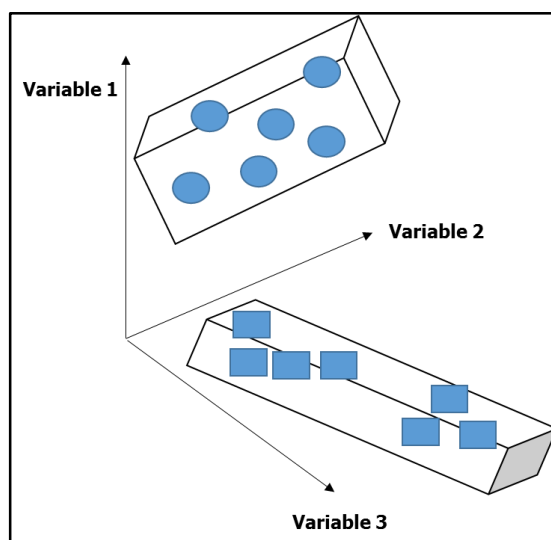


Figura 63. Hipercajas de cada clase en el modelo SIMCA

IV.3.1.4.5. Redes Neuronales Artificiales (ANN)

Las Redes Neuronales Artificiales¹⁵ son un conjunto de técnicas inspiradas en las redes neuronales biológicas del cerebro humano. Hacen uso de unidades de proceso idénticas ("neuronas") unidas en una red y cuyo objetivo es la realización de un modelo predictivo útil y aplicable en problemas de clasificación y modelización. Presentan una serie de características similares a un cerebro humano:

- *Aprender*: presentan un proceso inicial de entrenamiento de la red en el cual adquieren conocimiento a partir de la experiencia, estudio y ejercicio. Una vez entrenada, dicha red puede cambiar el comportamiento en función del entorno, es decir, mostrándole una serie de entradas, son capaces de producir ellas solas salidas consistentes.
- *Generalizar*: son capaces de generalizar automáticamente debido a su naturaleza y estructura. Por ello, pueden ofrecer respuestas correctas, dentro de un margen, a entradas con pequeñas variaciones debidas a ruido o distorsión.
- *Abstraer*: consideran por separado las cualidades de un objeto y las aíslan de las demás.

Son capaces de realizar la clasificación de forma supervisada o no supervisada. Para la clasificación no supervisada se precisa una etapa de entrenamiento de la red. En esta etapa, el sistema aprende a reconocer los objetos asociados a sus clases. Una vez entrenada la red, actúa de forma predictiva para nuevos objetos.

Para llevar a cabo la modelización, el sistema puede desarrollar la función sin conocimiento previo de la misma.

En la figura 64 se muestra un esquema de las partes que componen una red neuronal y su funcionamiento:

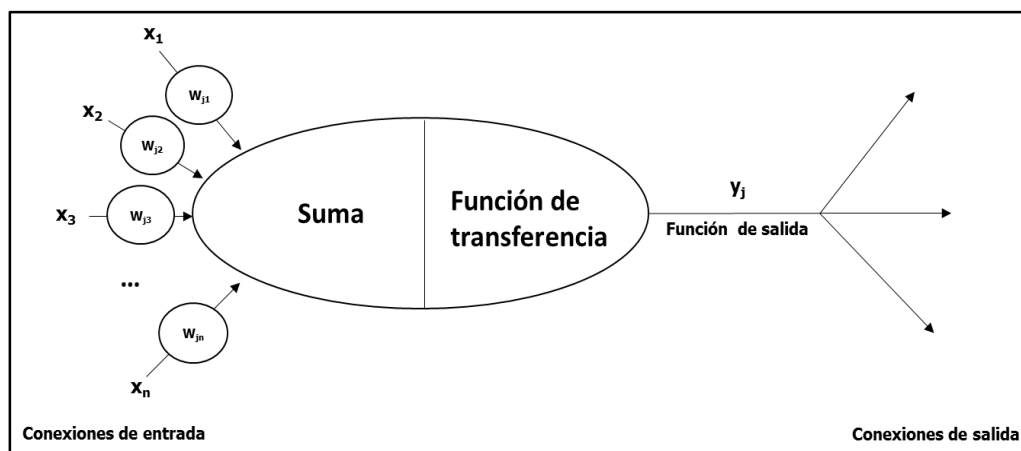


Figura 64. Esquema de funcionamiento de un nodo de una red neuronal artificial

De forma sencilla y muy resumida, la red neuronal está formada por una serie de nodos unidos entre sí. En cada uno de ellos se producen una serie de entradas x_n y para cada una de ellas se asigna un peso w_{pn} . En el interior de cada nodo se suman los pesos de las entradas (función

de propagación), se modifican (función de activación) o no, y, mediante una función de transferencia que puede ser de diferentes tipos, dicho sumatorio de pesos es transformado en una función de salida, que da lugar a una serie de respuestas. Varios nodos de este tipo forman una capa: modelo del Perceptrón creado por Rosenblatt¹⁶. Las respuestas de estos pueden ser a su vez las entradas de otros nodos, dando lugar así a diferentes capas que forman una red. Cuando las entradas provienen de las respuestas de nodos de la capa anterior y las salidas que se producen son a su vez las entradas de los nodos de la siguiente capa, la capa se denomina oculta.

La red puede presentar tantas capas como se desee, dando lugar a una arquitectura general como la que se presenta en el esquema de la figura 65, en el cual se refleja la estructura del Perceptrón multicapa:

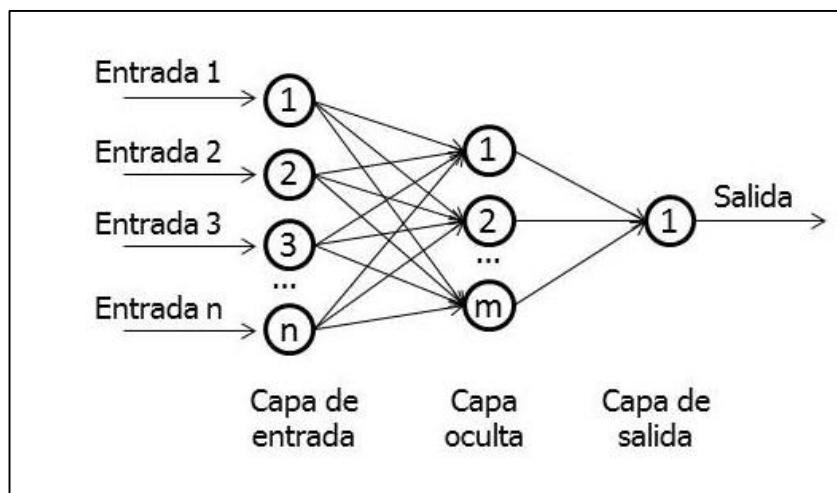


Figura 65. Red neuronal perceptrón multicapa, con n neuronas de entrada, m neuronas ocultas y una de salida

Los pesos son la función equivalente a la fuerza sináptica de una neurona, es decir, el cambio producido como consecuencia de la sinápsis en la señal. Dicha fuerza puede variar por lo que la información se modula adaptándose. Este es el mecanismo fundamental de todo el sistema y por tanto, la capacidad de adaptación de la fuerza sináptica a un problema particular es la esencia del aprendizaje.

Las neuronas poseen múltiples dendritas, y por tanto la célula recibe simultáneamente muchas señales, cada una afectada por una fuerza sináptica (peso de una red artificial). Así, dichas señales se suman para producir en cada momento un efecto colectivo o entrada de red. Este efecto de entrada de red se desconoce y por tanto, en ANN se hace una simplificación suponiendo que resulta de la suma de señales afectadas por pesos individuales. De esta forma se obtiene una función de salida (*Net*), formada por un vector de entrada (X) y uno de pesos (W):

$$Net = w_1x_1 + w_2x_2 + \dots + w_jx + \dots + w_nx_n = X \cdot W$$

El aprendizaje en una red neuronal consiste en encontrar el valor óptimo de los pesos numéricos w_{ji} de las unidades para que funcione correctamente. Para ello se entrena la red con un grupo de aprendizaje.

Como función de transferencia se pueden emplear diferentes tipos como por ejemplo:

- *Limitador duro binario*: la salida únicamente puede ser 0 o 1 dependiendo de si el valor de la función de salida supera o no el valor umbral fijado, denominado por v . Es una función muy sencilla y por tanto poco útil en muchas aplicaciones.
- *Función de umbral lógico*: similar al anterior pero posee un intervalo de activación dentro del cual la salida es proporcional Net. La anchura de dicho intervalo es un parámetro fundamental en este tipo de función.
- *Función sigmoidea*: la más ampliamente utilizada. Presenta un intervalo de activación no lineal, lo cual da lugar a ajustes mucho mejores que los de las anteriores funciones. La suposición fundamental de la teoría moderna de redes neuronales artificiales es que las señales de transferencia no dependen linealmente de Net. El algoritmo de retropropagación requiere que la función de transferencia sea derivable en todo el intervalo. Así, la función sigmoidea se introdujo inicialmente como una adaptación del limitador duro a esta condición. Con posterioridad, se demostró además su elevada potencialidad, especialmente en los neurodos de las capas ocultas.

IV.3.1.4.6. Análisis por PLS

El análisis por PLS⁸ es un algoritmo para llevar a cabo el proceso de calibración multivariante. En él, se dispone de dos matrices de datos, una matriz X compuesta por las características de las muestras fáciles de medir, y una matriz Y , formada por variables dependientes de X , difíciles de medir y que generalmente constituyen la información requerida. La ventaja de la calibración multivariante es la capacidad de creación de modelos de regresión sin necesidad de aislar el analito de interés de la matriz y liberarlo de interferentes.

Con un análisis por PLS, es posible trabajar simultáneamente diversas variables Y , por lo que es el algoritmo que se elige cuando se debe trabajar con varias variables intercorrelacionadas. En el análisis se realiza una descomposición PCA simultánea e independiente para cada variable de la matriz X e Y . De esta forma, la información de la matriz Y se utiliza en la descomposición óptima de la matriz X .

IV.3.2. RESULTADOS: CLASIFICACIÓN DE VINOS POR SU ÍNDICE ELECTROQUÍMICO

IV.3.2.1. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Existen multitud de clasificaciones de vinos, una de ellas, especialmente destinada a los vinos tintos, depende del tiempo de envejecimiento, procedimiento que no se lleva a cabo en la elaboración de un vino blanco. Así, se distingue entre un vino joven (seis meses), de crianza (dos años, al menos seis meses en bodega), reserva (tres años, uno de ellos en bodega) y gran reserva (cinco años, dos de ellos en bodega).

En el proceso de envejecimiento de un vino los compuestos fenólicos reaccionan dando lugar a polímeros y productos de condensación que derivan en cambios físicos y químicos¹⁷ del vino. Este proceso, es dependiente además del tipo de madera en el que se lleve a cabo¹⁸. Así, el perfil polifenólico de un vino va a depender del tipo de elaboración del mismo y en principio debe ser diferente en un vino joven y gran reserva por ejemplo.

Además, tal y como se ha explicado en el apartado de la Introducción, los compuestos fenólicos se desarrollan en la uva como respuesta a estímulos externos, por ejemplo la radiación UV. Esto hace que el clima, tipo de suelo y las diferentes prácticas agrícolas, sean factores clave en el desarrollo de este tipo de compuestos y que los vinos elaborados con diferentes tipos de uva puedan presentar diferente contenido polifenólico, pudiendo utilizar así este parámetro como una forma de identificarlos, distinguirlos de otros vinos de diferente variedad de uva y confirmar su autenticidad¹⁹.

Por otro lado, en España, existe un elevado número de denominaciones de origen, varias de ellas con importante reconocimiento internacional, que coinciden con las diferentes zonas geográficas del país. Cada denominación de origen debe contener las variedades de uva blanca o tinta permitidas por la legislación y en un porcentaje mínimo marcado por la misma. Por ejemplo, la denominación de origen de La Rioja, una de las más conocidas internacionalmente debe presentar como variedades de uva blanca al menos una de los tipos Viura, Malvasia, Garnacha Blanca, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Verdejo, Maturana Blanca, Tempranillo Blanco o Turruntés, y de las uvas tintas las permitidas son Tempranillo, Garnacha Tinta, Graciano, Mazuelo o Maturana Tinta²⁰.

Con esta información se ha decidido llevar a cabo un estudio con la posibilidad de crear un modelo en el cual, el contenido en polifenoles que presenta un vino sea útil para poder determinar su procedencia y por transposición su denominación de origen.

En el Apartado IV.1.2, se ha descrito el desarrollo de un método de detección amperométrica acoplada a un sistema de inyección el flujo mediante el cual se determina el índice electroquímico de una muestra de vino sin tratamiento previo de la misma. Dicho índice está relacionado con el contenido de polifenoles presente en el vino, y, como no se lleva a cabo la separación ni extracción de analitos, el valor obtenido se corresponde con la concentración total de polifenoles. De esta manera, se han medido una relación de muestras a tres potenciales de trabajo:

- **IE 0,350 V:** con este potencial se obtiene el valor correspondiente a la concentración de polifenoles que se oxidan a potenciales bajos. Este grupo de forma genérica se ha denominado polifenoles fácilmente oxidables.
- **IE 0,700 V:** el valor obtenido en la señal a este potencial engloba a los polifenoles fácilmente oxidables indicados en el apartado anterior, más los polifenoles que necesitan potenciales más altos, denominados genéricamente, difícilmente oxidables.

- **IE 0,900 V:** se corresponde con el valor obtenido para la concentración de polifenoles totales y engloba a los dos grupos nombrados junto con un tercero, denominado muy difícilmente oxidables.

Además, también en el mismo apartado, se han descrito los estudios de correlación realizados entre estos índices electroquímicos y los espectrofotométricos obtenidos al analizar las muestras de vino con los métodos oficiales descritos por la OIV, dando resultados positivos. Todo esto ha llevado a pensar en la posibilidad de construir un modelo de clasificación de dichas muestras, empleando los valores de sus índices electroquímicos obtenidos a tres potenciales de trabajo, que representan las fracciones de polifenoles presentes en vinos anteriormente descritas. La hipótesis planteada ha sido la comparación de los valores obtenidos para estas tres variables, con el fin de buscar similitudes y diferencias entre muestras de vinos con diferentes tipos de uva y de diferentes denominaciones de origen, que permitan la creación de algún tipo de modelo clasificatorio en función de parámetros únicamente electroquímicos. En la metodología desarrollada, el tratamiento de muestra es mínimo (sólo una dilución en disolución reguladora de trabajo) por lo que se aporta una importante ventaja para su incorporación en la industria de control de alimentos en general y al control de algunos parámetros de interés en la industria vitivinícola. La sencillez de método de análisis así como su bajo coste ya ha sido expuesta a lo largo del Apartado IV.1.2.

IV.3.2.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Este estudio se ha ensayado con una relación de muestras de vino blanco, resumidas en la tabla 8 del Apartado III.2.2, que pertenecen a diferentes denominaciones de origen españolas y presentan diferentes tipos de uvas.

Para el estudio se ha empleado el método descrito en el Apartado IV.1.2, con el electrodo modificado con dispersión de nanotubos de carbono y las condiciones elegidas. Así mismo, y aunque no se han introducido como variables del método de clasificación, se han realizado los ensayos espectrofotométricos descritos en la bibliografía para el análisis de polifenoles en vinos, a modo comparativo de los resultados obtenidos por los índices electroquímicos.

IV.3.2.3. RESULTADOS

IV.3.2.3.1. Primer estudio

Las muestras analizadas han sido etiquetadas con números como se muestra en la tabla 31:

Tabla 31. Etiquetas de las muestras de vino

Vino	Etiqueta
Don Simón	1
Elegido	2
Blanco Carrefour. Tierra Extremadura	3
Blanco Carrefour	4
Blanco Carrefour (marca blanca)	5
Don Simón Premium	6
Peñasol	7
Cerro de los pastores (Auchan)	8
Calle Real	9
Viña Albalí. Verdejo	10
Viña Marian. Verdejo	11
Valpincia. Verdejo	12
Emina. Rueda	13
Emina. Verdejo	14
Emina. Sauvignon	15
Blume. Rueda	16
Blume. Sauvignon	17
Blume. Verdejo	18
Estola. Verdejo	19
Los Molinos	20
Viña Espolón	21
Campo Viejo	22
Faustino Rivero	23
Monte Esquinza (Carrefour)	24
Vegas del Rivilla	25
Marqués de Riscal	26
Viña Sol	27
Viña Esmeralda	28
Puerta Cerrada	29
Batuta Chardonnay (Makro)	30
Batuta Airén (Makro)	31
Batuta Macabeo (Makro)	32
Consigna. Chardonnay	33
Añil	34
Viñas del Vero. Blanco	35
Viñas del Vero. Chardonnay	36

Como variables de estudio se han añadido dos más a las que anteriormente se han indicado, que corresponden a fracciones más específicas de polifenoles. En total se han empleado cinco variables, cuyo significado y nomenclatura a partir de este punto es el siguiente:

- **IE 0,350 V:** denominada en lo sucesivo X_1 , es el índice electroquímico obtenido a un potencial de 0,350 V. Este índice está relacionado con el grupo de polifenoles que se oxida a potenciales bajos, el cual se ha denominado "polifenoles fácilmente oxidables".
- **IE 0,700 V:** X_2 , corresponde al índice electroquímico que da como resultado la fracción de polifenoles fácilmente oxidables sumada a la de los que necesitan un potencial mayor para llevar a cabo el proceso.
- **IE 0,900 V:** X_3 , es el índice electroquímico que da como resultado el índice de polifenoles totales.
- **IE 0,700-0,350 V:** X_4 , relacionada directamente con la fracción de polifenoles que se oxida a potenciales mayores de 0,350 V y menores de 0,700 V, se ha denominado como "polifenoles difícilmente oxidables".
- **IE 0,900-0,700 V:** X_5 , correspondiente a la fracción de polifenoles que requieren potenciales elevados para oxidarse, denominada fracción de "polifenoles muy difícilmente oxidables".

Entre algunas de estas variables cabe esperar que se pueda presentar un alto grado de correlación, puesto que dos de ellas son combinaciones lineales de otras dos. Sin embargo, en principio no tendrían por qué correlacionar IE 0,350 V, IE 0,700-0,350 V e IE 0,900-0,700 V, por tratarse de variables que definen diferentes fracciones de compuestos polifenólicos presentes en la muestra, excepto que la presencia de un grupo influya en otro.

Además, se han introducido como variables cualitativas los diferentes tipos de uva que se presentan en la composición principal de los vinos, con el objetivo de relacionarlos con las variables cuantitativas de tipo electroquímico.

En la tabla 32 se muestra la matriz de datos, objetos y variables, compuesta por las corrientes en μA (datos) producidas al aplicar cada uno de los potenciales (variables) a cada una de las muestras de vino blanco (objetos).

Tabla 32. Matriz de objetos y variables. Resultados obtenidos para los índices electroquímicos a tres potenciales de trabajo y para las 36 muestras de vino blanco analizadas

Etiqueta	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
1	1,09	1,88	7,15	0,79	5,27
2	0,99	2,10	8,30	1,11	6,20
3	0,64	1,54	6,45	0,90	4,91
4	0,73	1,86	7,75	1,13	5,89
5	1,25	3,13	11,3	1,88	8,17
6	1,33	2,22	5,80	0,89	3,58
7	0,74	1,60	7,05	0,86	5,45
8	0,76	1,71	7,55	0,95	5,84
9	0,95	1,66	6,90	0,71	5,24
10	0,56	1,10	5,60	0,54	4,50
11	0,65	1,48	5,70	0,83	4,22
12	1,01	1,80	5,55	0,79	3,75
13	0,38	1,00	5,10	0,62	4,10
14	0,38	1,02	5,40	0,64	4,38
15	0,40	1,04	4,80	0,64	3,76
16	1,58	2,40	5,55	0,82	3,15
17	1,38	2,18	6,90	0,80	4,72
18	1,45	2,44	6,05	0,99	3,61
19	0,51	1,14	5,30	0,63	4,16
20	1,02	1,84	7,45	0,82	5,61
21	0,52	1,19	4,70	0,67	3,51
22	0,82	1,49	4,90	0,67	3,41
23	0,45	1,03	5,05	0,58	4,02
24	0,52	1,14	5,50	0,62	4,36
25	1,24	2,24	8,45	1,00	6,21
26	1,11	1,68	4,75	0,57	3,07
27	0,58	1,24	5,20	0,66	3,96
28	0,40	0,84	4,40	0,44	3,56
29	0,62	1,04	4,85	0,42	3,81
30	1,10	1,14	5,25	0,04	3,93
31	0,66	1,36	5,85	0,70	4,49
32	0,78	0,82	4,75	0,04	4,11
33	0,66	1,13	5,05	0,47	3,92
34	0,78	1,03	4,60	0,25	3,57
35	0,94	1,36	5,45	0,42	4,09
36	0,94	1,58	5,35	0,64	3,77

La elevada diferencia obtenida en el valor de las corrientes entre los diferentes potenciales de trabajo ha hecho necesario la realización de un escalado de los datos con el fin de evitar errores. La elevada escala que presentan los datos de la columna de la variable X₃ puede

asignarle mayor importancia de la que tiene en el análisis. Por ello se ha realizado un escalado por rango, empleando la ecuación 33 descrita en el Apartado IV.3.1.2. Con esta metodología se obtiene una matriz en la cual todos los valores de todas las variables se encuentran entre 0 y 1 sin variar la tendencia de los resultados. En la tabla 33 se muestra la matriz de datos autoescalados.

Tabla 33. Matriz de datos autoescalados

Etiqueta	X₁	X₂	X₃	X₄	X₅
1	0,59	0,46	0,40	0,41	0,43
2	0,51	0,55	0,57	0,58	0,61
3	0,22	0,31	0,30	0,47	0,36
4	0,29	0,45	0,49	0,59	0,55
5	0,73	1,00	1,00	1,00	1,00
6	0,79	0,61	0,20	0,46	0,10
7	0,30	0,34	0,38	0,44	0,47
8	0,32	0,39	0,46	0,49	0,54
9	0,48	0,36	0,36	0,36	0,43
10	0,15	0,12	0,17	0,27	0,28
11	0,23	0,29	0,19	0,43	0,22
12	0,53	0,42	0,17	0,41	0,13
13	0,00	0,08	0,10	0,32	0,20
14	0,00	0,09	0,14	0,33	0,26
15	0,02	0,10	0,06	0,33	0,14
16	1,00	0,68	0,17	0,42	0,02
17	0,83	0,59	0,36	0,41	0,32
18	0,89	0,70	0,24	0,52	0,11
19	0,11	0,14	0,13	0,32	0,21
20	0,53	0,44	0,44	0,42	0,50
21	0,12	0,16	0,04	0,34	0,09
22	0,37	0,29	0,07	0,34	0,07
23	0,06	0,09	0,09	0,29	0,19
24	0,12	0,14	0,16	0,32	0,25
25	0,72	0,61	0,59	0,52	0,62
26	0,61	0,37	0,05	0,29	0,00
27	0,17	0,18	0,12	0,37	0,17
28	0,02	0,01	0,00	0,22	0,10
29	0,20	0,10	0,07	0,21	0,14
30	0,60	0,14	0,12	0,00	0,17
31	0,23	0,23	0,21	0,36	0,28
32	0,33	0,00	0,05	0,00	0,20
33	0,23	0,13	0,09	0,23	0,17
34	0,33	0,09	0,03	0,11	0,10
35	0,47	0,23	0,15	0,21	0,20
36	0,47	0,33	0,14	0,33	0,14

En un estudio de este tipo es necesario inicialmente proyectar el conjunto de datos en un espacio, con el objetivo de encontrar posibles grupos de muestras que no son fácilmente definidos simplemente con la matriz original. Sin embargo, el número de variables (cinco) hace muy complicada la representación gráfica y prácticamente imposible de visualizar. Cuando esto ocurre se emplea el análisis de componentes principales, descrito en el Apartado IV.3.1.3. Esta técnica ha permitido la representación de las muestras en un espacio de dos componentes principales que recogen la información aportada por las cinco variables, y que por tanto forman un plano fácilmente interpretable.

Cuando se emplea una técnica de este tipo, los cálculos matemáticos utilizados buscan combinaciones lineales de las variables (componentes principales) que sean capaces de explicar la máxima variabilidad posible de los resultados. Por ello, lo primero que se hace es buscar correlaciones entre las mismas de las cuales se puede obtener además información acerca de la relevancia o no de algunas, así como descubrir por ejemplo variables redundantes. Estas correlaciones se resumen en la matriz de correlación de Pearson descrita en la tabla 34. En esta matriz, matemáticamente, los valores próximos a la unidad tienen como significado elevada correlación, la cual puede ser directa u opuesta en función del signo positivo o negativo respectivamente.

Tabla 34. Matriz de correlación de Pearson

Variables	X₁	X₂	X₃	X₄	X₅
X₁	1	0,826	0,436	0,351	0,169
X₂	0,826	1	0,772	0,818	0,531
X₃	0,436	0,772	1	0,838	0,948
X₄	0,351	0,818	0,838	1	0,709
X₅	0,169	0,531	0,948	0,709	1

La correlación entre las variables IE 0,900 V e IE 0,900-0,700 V (X₃ y X₅) es la más importante, sin embargo también se producen correlaciones significativas entre algunas como los índices electroquímicos a 0,900 y 0,700 V (X₂) con la fracción de polifenoles que se oxida a potenciales entre 0,700 y 0,350 V (X₁), así como entre las fracciones de polifenoles que corresponden a los índices electroquímicos a 0,350 V y 0,700 V.

El IE 0,900 V representa el índice de polifenoles totales y es lógico que su correlación con el resto de variables sea importante. A su vez, el IE 0,700 V representa la suma de los polifenoles fácilmente oxidables y difícilmente oxidables y por ello presenta correlación significativa con IE 0,350 V. Por otro lado, las señales obtenidas de las variables correspondientes a IE 0,350 V, IE 0,700-0,350 V e IE 0,900-0,700 V están producidas por diferentes fracciones de compuestos polifenólicos, por lo que el hecho de su baja correlación posiblemente supone que la presencia de cada una de esas fracciones no influye en la presencia de las otras dos.

En la teoría del análisis de componentes principales se ha explicado cómo se calculan los componentes principales así como su significado. En la realización del análisis se obtiene el mismo número de componentes principales que de variables introducidas, siendo el primero el que explica la mayor variabilidad de resultados. Cada componente principal es un vector que

tiene asociado un autovalor. Este será más elevado cuando explique la mayor variabilidad y por tanto el primero debe tener el mayor autovector.

En este estudio se han introducido cinco variables por lo que la varianza total (que corresponde al 100%) es igual a cinco. En la tabla 35, que muestra los autovalores obtenidos, se puede observar que el componente 1, con un autovalor de 3,622 sobre un total de 5, explica un 72,4% de la variabilidad total del conjunto de muestras y que sólo son necesarios tres componentes para explicar el 100%. Como las variables introducidas en el sistema son cinco y sólo se han obtenido tres componentes, existe un problema de redundancia. Realmente las variables X_4 y X_5 son combinaciones lineales de las otras tres, por lo que es probable que no sea necesario emplearlas.

Tabla 35. Tabla de autovalores, porcentaje de varianza y porcentaje de varianza acumulada de los factores principales

	PC1	PC2	PC3
Autovalor	3,622	1,063	0,315
Varianza (%)	72,444	21,259	6,296
Varianza acumulada	72,444	93,704	100,000

Los coeficientes obtenidos para las variables en las combinaciones lineales dan lugar a las siguientes funciones para los componentes principales:

$$PC1 = 0,327X_1 + 0,485X_2 + 0,503X_3 + 0,471X_4 + 0,428X_5$$

$$PC2 = 0,734X_1 + 0,355X_2 - 0,243X_3 - 0,160X_4 - 0,501X_5$$

$$PC3 = -0,355X_1 + 0,221X_2 - 0,268X_3 + 0,730X_4 - 0,468X_5$$

Para la interpretación física de los componentes principales se hace imprescindible estudiar la matriz de pesos de las variables, de la cual se deduce la correlación entre cada variable con cada componente. Matemáticamente, valores próximos a la unidad para los pesos suponen correlaciones elevadas. En la tabla 36 se muestra la matriz de pesos obtenida de este estudio:

Tabla 36. Pesos de las variables, correlación entre variables y factores

	PC1	PC2	PC3
X₁	0,622	0,757	-0,199
X₂	0,922	0,366	0,124
X₃	0,956	-0,250	-0,151
X₄	0,897	-0,165	0,410
X₅	0,815	-0,516	0,263

Todas las variables tienen una correlación significativa con el componente principal 1, especialmente los índices electroquímicos a 0,700 V y 0,900V, así como el índice que representa a la fracción de polifenoles muy difícilmente oxidable. El componente principal 2 viene explicado fundamentalmente por los índices electroquímicos que representan las fracciones de polifenoles que requieren potenciales de oxidación bajos y moderados mientras presenta correlación negativa con la fracción de polifenoles más difícilmente oxidable. La interpretación

física de los factores no es del todo sencilla, sin embargo se observa que valores de índices electroquímicos que representan fracciones de polifenoles con elevado potencial de oxidación así como la fracción total de polifenoles tienen mayor poder para distinguir entre las diferentes muestras.

Con las combinaciones lineales descritas, se han calculado las puntuaciones de los objetos en el espacio de los componentes principales así como los centroides de las clases (definidas por cada tipo de uva), y se han representado en las direcciones de los dos primeros tal y como se muestra en la figura 66.

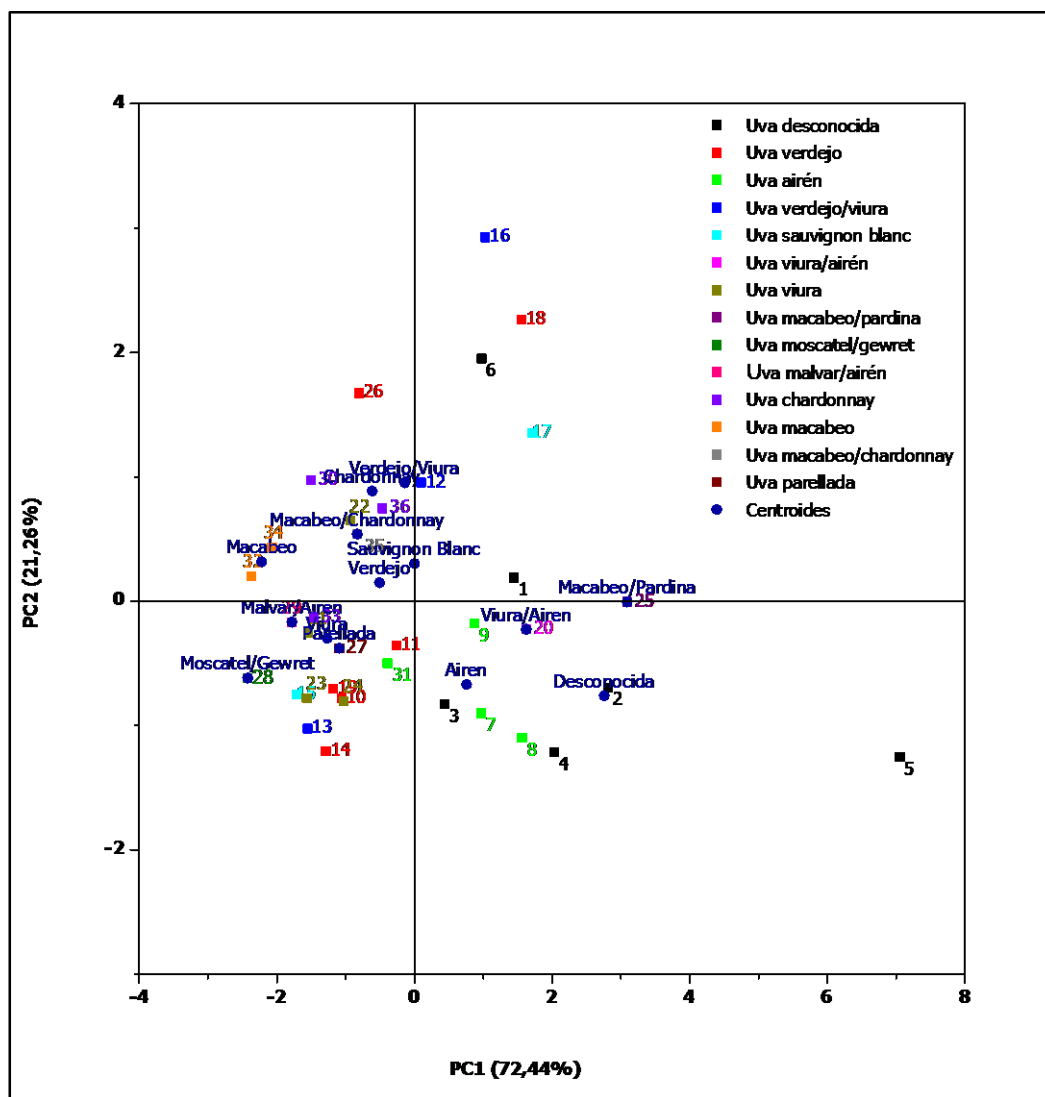


Figura 66. Representación de los objetos en el espacio de los dos primeros componentes principales (factores)

De la representación del gráfico de la figura 66 se ha observado que el centroide de las muestras que pertenecen a vinos en cuya composición presentan uvas de variedad Airén, se dirige hacia la zona del espacio contraria al de las muestras que contienen uvas de variedad Verdejo. Concretamente, el de las muestras con Airén se sitúan en puntos del espacio cercanos

a valores elevados de fracción de polifenoles con potencial de oxidación elevado, mientras que el de las muestras con uvas Verdejo se sitúan en la región contraria a esta.

De forma ideal se pretende obtener una representación en la cual las clases estén bien separadas entre sí y las muestras que la componen se sitúen alrededor de los centroides de cada una. Como las direcciones de los componentes principales están definidas por los índices totales de polifenoles (componente 1) y el índice a potencial 0,350 V (componente 2), la formación de grupos diferenciados confirma la posibilidad de creación de un modelo clasificatorio en función sólo del valor que presentan para estos parámetros los diferentes tipos de uva que pueden aparecer principalmente en la composición de un vino.

Tal y como se puede ver en la relación de vinos analizados descrita en la tabla 8 del Apartado III.2.2, se han empleado un número muy elevado de grupos con diferentes tipos de uvas y con un número de muestras en cada grupo muy reducido, en algunos casos una única muestra. Esto hace prácticamente imposible decidir si las muestras del mismo tipo se dirigen hacia la misma zona, lo que supondría confirmar que presentan similitud en los parámetros de estudio y que además se distinguen claramente de las demás. Estos resultados han llevado a estudiar una acotación del problema inicial: sólo dos grupos con dos variedades de uva diferentes y un mayor número de muestras en cada grupo.

La tendencia que muestran los resultados comentados ha llevado a decidir estudiar vinos con las variedades de uva tipo Airén y Verdejo. Estos dos tipos de uva, son ampliamente utilizados en España para la elaboración de vinos blancos. La denominación de origen Rueda, tiene como uva principal la uva tipo Verdejo, mientras la uva Airén es la exigida en la denominación de origen Valdepeñas.

IV.3.2.3.2. Segundo estudio

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado 15 muestras de vino en cuya composición está principal o exclusivamente la variedad de uva Verdejo (nombradas desde V1 a V15) y 16 en las que la variedad de uva es tipo Airén (nombradas de A1 a A16). Además, las muestras pertenecen a diferentes Denominaciones de Origen siendo las que tienen variedad de uva Verdejo de Rueda, mientras que las que tienen uva tipo Airén son de Valdepeñas, Tierra de Castilla y La Mancha. En la tabla 9 del Apartado III.2.2 se describe la relación de vinos analizados con su Denominación de Origen de pertenencia y el tipo de uva que presentan en su composición.

Para una mejor interpretación de la representación de objetos, las muestras se han nombrado con la etiqueta V1 y hasta V15 para las muestras de tipo Verdejo y A1 hasta A16 para las muestras tipo Airén. Se ha repetido el estudio de los índices electroquímicos obteniéndose una matriz de objetos y variables como la descrita, mostrada en la tabla 37, a la que también se ha aplicado un escalado empleando el mismo procedimiento descrito en la sección anterior y obteniéndose la matriz de datos mostrada en la tabla 38.

Tabla 37. Matriz de objetos y variables. Resultados obtenidos para los índices electroquímicos a tres potenciales de trabajo y para las muestras de vino blanco analizadas

Etiqueta	X₁	X₂	X₃	X₄	X₅
V1	1,22	2,52	5,30	1,30	2,78
V2	1,23	2,67	5,41	1,44	2,74
V3	1,29	2,17	5,15	0,88	2,98
V4	2,90	3,28	5,62	0,38	2,34
V5	0,96	1,80	5,22	0,84	3,42
V6	0,70	1,36	4,26	0,66	2,90
V7	1,01	1,85	5,14	0,84	3,29
V8	1,05	2,02	4,62	0,97	2,60
V9	1,08	2,54	4,11	1,46	1,57
V10	2,16	3,43	5,03	1,28	1,60
V11	1,11	2,25	5,55	1,13	3,30
V12	2,04	3,39	4,97	1,35	1,58
V13	1,48	2,35	3,01	0,88	0,66
V14	1,26	2,04	2,95	0,79	0,91
V15	0,79	2,17	2,90	1,38	0,73
A1	1,95	3,12	6,47	1,17	3,35
A2	1,35	2,69	6,24	1,35	3,55
A3	1,15	2,56	6,21	1,42	3,64
A4	1,70	2,84	6,70	1,13	3,87
A5	1,50	2,71	6,73	1,21	4,03
A6	1,78	3,74	7,38	1,97	3,64
A7	1,58	3,52	7,49	1,94	3,97
A8	1,59	2,53	7,05	0,95	4,51
A9	1,94	3,42	7,24	1,48	3,82
A10	1,75	2,52	6,59	0,77	4,07
A11	1,74	2,85	6,26	1,11	3,41
A12	1,65	3,74	7,11	2,09	3,37
A13	1,81	2,55	5,97	0,74	3,43
A14	1,62	2,72	5,57	1,11	2,85
A15	2,03	3,95	7,58	1,92	3,63
A16	1,70	3,67	7,83	1,98	4,16

Tabla 38. Matriz de datos autoescalados

Etiqueta	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
V1	0,24	0,45	0,49	0,54	0,55
V2	0,24	0,50	0,51	0,62	0,54
V3	0,27	0,31	0,46	0,30	0,60
V4	1,00	0,74	0,55	0,00	0,44
V5	0,12	0,17	0,47	0,27	0,72
V6	0,00	0,00	0,28	0,17	0,58
V7	0,14	0,19	0,45	0,27	0,68
V8	0,16	0,25	0,35	0,35	0,50
V9	0,17	0,45	0,25	0,63	0,24
V10	0,66	0,80	0,43	0,52	0,24
V11	0,19	0,34	0,54	0,44	0,69
V12	0,61	0,78	0,42	0,57	0,24
V13	0,35	0,38	0,02	0,29	0,00
V14	0,25	0,26	0,01	0,24	0,07
V15	0,04	0,31	0,00	0,59	0,02
A1	0,57	0,68	0,72	0,46	0,70
A2	0,29	0,51	0,68	0,57	0,75
A3	0,20	0,46	0,67	0,61	0,77
A4	0,46	0,57	0,77	0,44	0,83
A5	0,36	0,52	0,78	0,49	0,87
A6	0,49	0,92	0,91	0,93	0,77
A7	0,40	0,83	0,93	0,91	0,86
A8	0,40	0,45	0,84	0,33	1,00
A9	0,56	0,80	0,88	0,64	0,82
A10	0,48	0,45	0,75	0,23	0,88
A11	0,47	0,57	0,68	0,43	0,71
A12	0,43	0,92	0,85	1,00	0,70
A13	0,50	0,46	0,62	0,21	0,72
A14	0,42	0,53	0,54	0,43	0,57
A15	0,61	1,00	0,95	0,90	0,77
A16	0,45	0,89	1,00	0,93	0,91

En primer lugar se ha realizado una comparación de las medias obtenidas para cada grupo de muestras con cada variable introducida, con los datos escalados de cada una. Para ello se ha realizado un análisis t de Student cuyos resultados se muestran para cada una de las variables en la tabla 39:

Tabla 39. Resultados del test t de comparación de medias

	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
Intervalo de confianza	[-0,246; 0,034]	[-0,374; -0,047]	[-0,508; -0,223]	[-0,342; -0,025]	[-0,467; -0,177]
Diferencia	-0,106	-0,210	-0,365	-0,184	-0,322
t (Valor observado)	-1,545	-2,617	-5,208	-2,356	-4,522
 t (Valor crítico)	2,035	2,035	2,035	2,035	2,035
GDL	33	33	33	33	33
p-valor (bilateral)	0,132	0,013	<0,0001	0,025	<0,0001
Alfa	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

En la realización del test, se considera que la hipótesis nula es una diferencia entre medias igual a cero mientras que la hipótesis alternativa es que dicha diferencia es distinta de cero. En la tabla 39 se muestran los valores para los intervalos de confianza obtenidos, la diferencia entre las medias de cada grupo con cada una de las variables de estudio, el valor de t calculado, el valor de t crítico para los grados de libertad (GDL) y el nivel de confianza (95%), así como el resultado obtenido para la significación bilateral (p-valor). Si el resultado de este valor es pequeño, (inferior a 0,05) debe rechazarse la hipótesis nula de la igualdad de medias y aceptar la hipótesis alternativa. Tal y como se muestra en la tabla 39, esta condición se cumple en todos los casos excepto para la variable X₁. Además, se ha realizado el estudio del poder discriminatorio entre clases por las variables empleando el cálculo de los pesos de Fisher y ha dado como resultado los valores que se muestran en la tabla 40:

Tabla 40. Valores de los pesos de Fisher para las variables

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
0,059	0,268	0,432	0,281	0,255

La variable X₁ presenta un valor próximo a 0 relacionado con un bajo poder discriminante entre los dos grupos, prácticamente nulo. Con ambos estudios se concluye que esta variable, correspondiente al índice electroquímico a potenciales bajos, no contribuye a la distinción entre estos dos grupos de muestras y por ello se ha decidido no introducirla en los cálculos para la creación de un modelo de clasificación.

A continuación se ha llevado a cabo un análisis de clúster y se ha obtenido un dendrograma (figura 67) correspondiente a una clasificación de tipo jerárquico en el cual se ha observado la agrupación de las muestras en dos clases coincidentes con los tipos de uva que se presentan en su composición. El análisis de clúster es una técnica de clasificación no supervisada que

aporta una primera idea de la existencia de similitudes entre muestras en función de las variables introducidas, que puede indicar relaciones y/o agrupamientos latentes entre ellas.

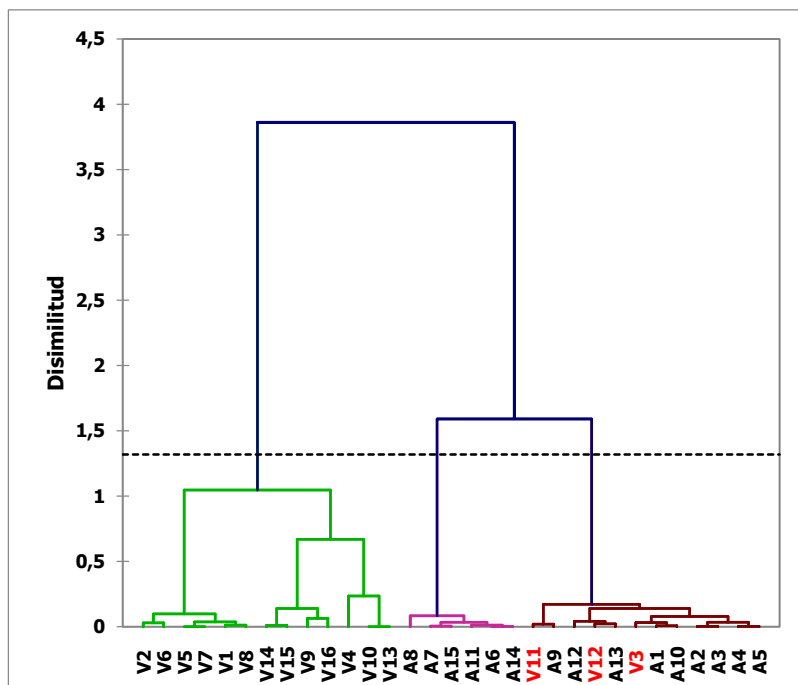


Figura 67. Dendrograma construido con las cuatro variables introducidas

Se han utilizado el método de Ward para la formación de clústeres en función de la distancia Euclídea (de menor a mayor distancia) que presenta cada uno de los objetos con los centroides de cada clase. En el dendrograma se puede observar que todas las muestras están formando dos grupos para una disimilitud superior a 1,5 que coinciden con la clase a la que pertenecen. Solamente tres muestras de tipo Verdejo son agrupadas junto con la variedad de uva tipo Airén. Por tanto, en un principio se puede deducir que los valores para los índices electroquímicos son similares entre sí con cada tipo de uva y diferentes la una de la otra.

Para confirmar la existencia de los agrupamientos sugerida por el análisis de clúster, se recurrió al análisis de componentes principales para obtener la información que permita una visualización más efectiva de la distribución de muestras, de manera similar a la mostrada en la figura 66.

Además, con la aplicación de este análisis también se obtiene información sobre correlaciones de variables que puedan aportar redundancia a los resultados y por tanto se puedan eliminar, así como saber cuáles son las imprescindibles a utilizar.

La matriz de correlación de Pearson mostrada en la tabla 41, indica que existe correlación significativa del índice electroquímico a potencial 0,700 V con los índices a 0,900 V y a 0,700-0,350 V (variables X_2 , X_3 y X_4 respectivamente). La variable X_2 en realidad forma parte de las otras dos variables por lo que la correlación es lógica y previsible. Lo mismo ocurre con las variables X_3 y X_5 , correspondientes a los índices electroquímicos a 0,900 V y a la diferencia 0,900-0,700 V, cuya correlación es significativa y una engloba a la otra.

Tabla 41. Matriz de correlación de Pearson

Variables	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
X ₂	1	0,683	0,726	0,258
X ₃	0,683	1	0,550	0,882
X ₄	0,726	0,550	1	0,259
X ₅	0,258	0,882	0,259	1

En el problema inicial el número de variables empleadas es cuatro, por tanto y al igual que en el primer estudio, al tratarse de datos estandarizados, la varianza total será igual a 4. Dicha varianza se reparte entre los factores dando lugar a los autovalores que se muestran en la tabla 42:

Tabla 42. Tabla de autovalores, varianza y varianza acumulada de los factores principales

	PC1	PC2	PC3
Valor propio	2,707	1,002	0,291
Variabilidad (%)	67,676	25,060	7,263
% acumulado	67,676	92,737	100,000

El componente principal 1, tiene un autovalor correspondiente de 2,707 sobre un total de 4 y por tanto explica más de la mitad de la variabilidad total de los datos. Junto con el componente 2 explican casi el 93% de la varianza total de los datos. En este caso, al igual que en el primero, sólo es necesario un componente más para describir el 100% de la varianza total por lo que de nuevo se presenta un caso de redundancia de variables. Este hecho no sorprende teniendo en cuenta que las variables X₄ y X₅ son en realidad combinaciones lineales de las otras y en la variable X₃ está en cierto modo englobada la variable X₂, puesto que al potencial 0,900 V se oxidarán los compuestos que lo hicieron también a potencial inferior y se le sumará la fracción de los muy difícilmente oxidables.

Los coeficientes obtenidos para cada variable dan lugar a las siguientes expresiones que definen las combinaciones lineales de cada componente principal:

$$PC1 = 0,498X_2 + 0,580X_3 + 0,466X_4 + 0,446X_5$$

$$PC2 = -0,457X_2 + 0,285X_3 - 0,509X_4 + 0,672X_5$$

$$PC3 = -0,642X_2 - 0,173X_3 + 0,724X_4 - 0,185X_5$$

Para poder realizar la interpretación física de cada componente principal es necesario tener en cuenta la matriz de pesos de las variables (tabla 43), de la cual se puede deducir la correlación entre las mismas y los componentes.

Tabla 43. Matriz de pesos de las variables en los componentes principales

	PC1	PC2	PC3
X₂	0,819	-0,458	-0,346
X₃	0,954	0,285	-0,093
X₄	0,767	-0,509	0,390
X₅	0,733	0,673	0,100

Todas las variables correlacionan positivamente y de forma significativa con el componente principal 1, de manera que de forma general, las muestras con valores más elevados se situarán en la zona del plano contraria a las que tengan menor valor para todos los índices electroquímicos. Con el componente 2, las variables que corresponden a las fracciones difícil y muy difícilmente oxidables presentan correlación significativa y además de signo contrario, lo que situará en lugares contrarios a las muestras que contengan elevada fracción de los polifenoles difíciles de oxidar junto con pequeña fracción de los muy difíciles de oxidar y viceversa.

Con los valores obtenidos para cada muestra con cada variable y empleando las combinaciones lineales definidas para cada factor, se ha calculado la matriz de puntuaciones de los objetos en el espacio de los componentes principales, y de la misma manera se han obtenido los valores para los centroides de las dos clases analizadas. La representación de objetos (scores) y centroides en el espacio de los componentes principales toma la forma que se muestra en las figuras 68 y 69 en las cuales se han representado los planos formados por los componentes 1 y 2 y los componentes 1 y 3 respectivamente.

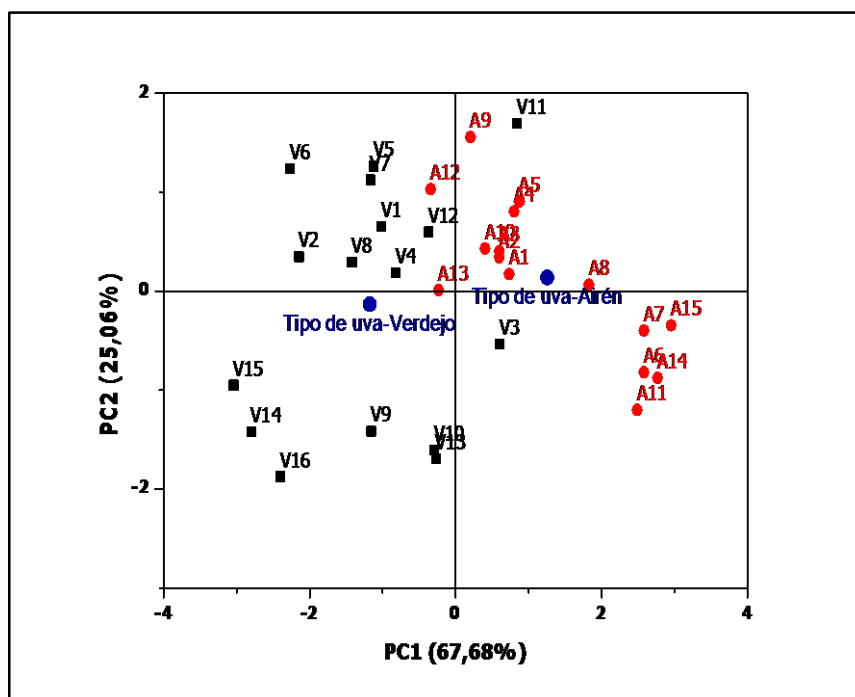


Figura 68. Representación de los objetos en el espacio de los dos primeros componentes principales

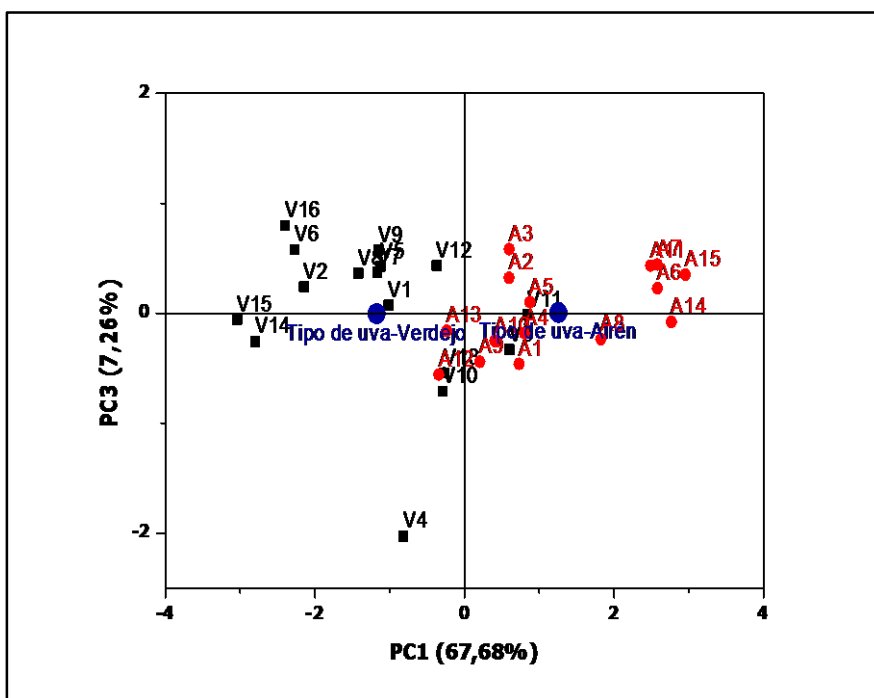


Figura 69. Representación de las muestras en el espacio de los componentes principales 1 y 3

En las dos representaciones se observa claramente que el centroide de las dos clases se sitúa en los lados opuestos del eje correspondiente al componente principal 1 y las muestras se sitúan alrededor de sus respectivos centroides próximas a ellos. En el grupo de las muestras de vinos con variedad de uva Airén es importante destacar que éstas están situadas más próximas unas a otras que las muestras de vinos con uvas de variedad Verdejo, por lo que cabe esperar menor variabilidad intraclass en el "grupo Airén". Los vinos procedentes de esta variedad de uva se sitúan, mayoritariamente, en el espacio positivo del primer componente, por lo que sus índices electroquímicos deben ser valores más elevados que para los vinos procedentes de uva tipo Verdejo. Además, de la representación se deduce que la mayor discriminación entre grupos se produce por la información que recoge el componente principal 1, relacionado directamente con todos los índices electroquímicos, siendo especialmente importante la contribución de la variable que informa sobre el contenido total de polifenoles (IE 0,900 V).

Los resultados obtenidos mediante PCA sugieren que los índices electroquímicos aportan información relevante para la discriminación de muestras especialmente las variables que corresponden a fracciones totales de polifenoles. Además, se ha confirmado la información que se había obtenido del análisis de clúster en relación con la agrupación de los vinos en dos clases que coinciden con la variedad de uva que los componen.

Basándose en la capacidad de discriminación latente en estos índices electroquímicos, finalmente se ha estudiado su posible aplicación para elaborar un modelo de clasificación de muestras de vino. Empleando este modelo y los datos experimentales de estos índices podría ser posible clasificar nuevas muestras de vinos hechos con uvas tipo Verdejo o Airén e identificar el tipo de uva con el que se elaboraron. Por ello se ha decidido utilizar el análisis discriminante, una técnica de clasificación supervisada en la cual la matriz de datos forma un

grupo de entrenamiento con el que se construye el modelo. A su vez, este modelo se valida de forma interna con una de las técnicas que se han descrito en la introducción de este capítulo y, de forma opcional, se realiza una validación externa con un grupo de muestras no empleado en la modelización. La validación se ha realizado empleando la técnica del *Leave-one-out*, cuya traducción al castellano es “dejar uno fuera”.

Además se ha decidido eliminar cuatro muestras de la matriz original y crear con ellas un grupo de validación externo, por lo que el grupo de entrenamiento se compone de 29 objetos.

El análisis discriminante calcula una función que permita clasificar las muestras y asignarlas a una de las clases que se hayan definido en función del obtenido de las variables introducidas en el modelo.

Primero es necesario descartar problemas de multicolinealidad que pueden dar lugar a:

- Varianzas de estimadores muy grandes.
- Aceptar la hipótesis nula de que un parámetro es cero aun cuando la variable correspondiente sea relevante.
- Elevada sensibilidad de los coeficientes estimados ante pequeños cambios en los datos.

La tolerancia y factor de inflación de la varianza (VIF) son indicadores que miden el grado de multicolinealidad de las variables de un modelo y para cada uno se utilizan las expresiones que se muestran en las ecuaciones 35 y 36:

$$VIF = \frac{1}{1 - R^2}$$

Ecuación 35. Factor de inflación de la varianza

$$TOL = \frac{1}{VIF}$$

Ecuación 36. Expresión para la tolerancia

En donde R^2 es el coeficiente de determinación de la regresión auxiliar de la variable X sobre el resto de variables explicativas.

Para entender el concepto de VIF se debe indicar que un aumento de la multicolinealidad de una de las variables del modelo implica que la varianza de su coeficiente crece porque el denominador de la fórmula disminuye. Por tanto, la multicolinealidad infla la varianza del coeficiente. El VIF tiene valor mínimo de 1 cuando no hay grado de multicolinealidad. A medida que esta aumenta, el VIF aumenta, sin tener límite superior. En general se considera que a valores de VIF superiores a 10 existen problemas de multicolinealidad. La tolerancia se define como la proporción de varianza de una variable independiente que no está explicada por las demás variables independientes. Toma valores entre 0 y 1, en donde 1 significa ausencia de multicolinealidad de una variable con las demás y 0 cuando la variable es una combinación lineal perfecta de las otras.

La tabla 44 muestra el análisis de multicolinealidad obtenido al realizar el modelo con todas las variables:

Tabla 44. Estadística de multicolinealidad

Estadística	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
Tolerancia	0,397	0,578	0,523	0,000
VIF	2,519	1,730	1,914	

En la tabla 44 de resultados se muestra que los valores de tolerancia y VIF de las variables son aceptables excepto para la última, cuyo valor de la tolerancia es 0, lo que implica que presenta un problema de multicolinealidad. Por esto se ha repetido el análisis eliminando esta variable obteniéndose valores aceptables para la tolerancia y VIF de todas las variables (tabla 45):

Tabla 45. Estadística de multicolinealidad

Estadística	X ₂	X ₃	X ₄
Tolerancia	0,397	0,578	0,523
VIF	2,519	1,730	1,914

El análisis discriminante inicialmente hace la suposición de que las matrices de las covarianzas intraclase para los diferentes grupos son iguales. En la tabla 46 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de Box²¹ para la comprobación de la homogeneidad de varianzas:

Tabla 46. Resultados de la prueba de Box

-2Log(M)	29,421
F (Valor observado)	4,258
F (Valor crítico)	2,101
GDL1	6
GDL2	4452
p-valor	0,000
alfa	0,05

El valor de F observado para la comparación de varianzas es superior al valor crítico por lo cual se debe aceptar la hipótesis alternativa de que las matrices de las covarianzas intraclase no son iguales y rechazar la nula que suponía que eran iguales. Cuando esto ocurre, lo que se obtiene es una función discriminante cuadrática y no una función discriminante lineal consecuencia de la aceptación de la hipótesis nula.

La Lambda de Wilks²² es un parámetro mediante el cual se mide el poder discriminante de una función y se puede aplicar a las variables por separado y a la función global obtenida. Matemáticamente es igual al cociente entre la suma de cuadrados dentro de los grupos y la suma de cuadrados total (sin distinguir grupos). Es decir, equivale a las desviaciones a la media dentro de cada grupo entre las desviaciones a la media total sin distinguir grupos.

$$\Lambda = \frac{\text{Suma de cuadrados intragrupos}}{\text{Suma de cuadrados total}} = \frac{|S|}{|T|}$$

Ecuación 37. Expresión para la Lambda de Wilks

Según la ecuación 37, si el valor de Lambda es pequeño la variable discrimina mucho, puesto que la suma de los cuadrados entre los miembros de un mismo grupo será muy inferior con respecto al total. La tabla 47 muestra los resultados de la Lambda de Wilks obtenidos para cada una de las variables introducidas en el modelo. De esta tabla se deduce que solamente una variable, la correspondiente con el índice total de polifenoles, tiene capacidad para distinguir entre los miembros de las dos clases estudiadas.

Tabla 47. Igualdad de las medias de las clases

Variable	Lambda	F	GDL1	GDL2	p-valor
X₂	0,753	8,210	1	25	0,008
X₃	0,486	26,479	1	25	< 0,0001
X₄	0,811	5,844	1	25	0,023

De la misma manera se ha estudiado el poder discriminatorio de la función obtenida resultando ser bueno, con un valor de Lambda de Wilks igual a 0,475.

La función discriminante cuadrática tiene como coeficientes canónicos los valores que se muestran en la tabla 48 para cada uno de las variables de la combinación:

Tabla 48. Valores de los coeficientes de la función discriminante canónica

	F1
Intersección	-3,029
X₂	-0,204
X₃	4,637
X₄	1,007

La función canónica descrita ha sido capaz de asignar con éxito todas las muestras del grupo de entrenamiento excepto dos, dando lugar a una matriz de confusión como la que se muestra en la tabla 49:

Tabla 49. Matriz de confusión del grupo de entrenamiento

de \ a	Airén	Verdejo	Total	% correcto
Airén	12	1	13	92,31%
Verdejo	1	13	14	92,86%
Total	13	14	27	92,59%

La utilización del *leave-one-out* como metodología de validación interna ha resultado en una matriz de confusión como la que se muestra en la tabla 50, derivada de la asignación correcta de todas las muestras excepto cuatro.

Tabla 50. Matriz de confusión de la validación cruzada utilizando el *leave-one-out*

de \ a	Airén	Verdejo	Total	% correcto
Airén	10	3	13	76,92%
Verdejo	2	12	14	85,71%
Total	12	15	27	81,48%

Además, con las muestras V6, V8, A3 y A6 se ha creado un grupo de validación externa, en el cual se han clasificado bien todas las muestras excepto una, dando lugar a la matriz de confusión de la tabla 51:

Tabla 51. Matriz de confusión para la validación externa

de \ a	Airén	Verdejo	Total	% correcto
Airén	1	1	2	50,00%
Verdejo	0	2	2	100,00%
Total	1	3	4	75,00%

Los resultados obtenidos muestran la capacidad del proceso analítico desarrollado para discriminar entre dos grupos de vinos de dos variedades de uva y deben tomarse como el punto de partida en el estudio de esta metodología por varias razones: las ventajas experimentales se han descrito en el desarrollo del Apartado IV.1.2, entre las cuales cabe destacar que no se necesita tratamiento de muestra, el volumen consumido de la misma es bajo y el método desarrollado es exacto, reproducible y con bajos límites de detección. Por otro lado, el tratamiento estadístico de los datos ha resultado en la creación de un modelo de clasificación que deja el camino abierto hacia su ampliación. El objetivo debe encaminarse a introducir en el mismo un mayor número de grupos de muestras de vinos procedentes de más variedades de uva, así como introducir vinos tintos e incluso aplicar sus bases hacia el estudio de otro tipo de muestras de bebidas que presentan compuestos antioxidantes como por ejemplo la cerveza o el té. La idea principal debe centrarse en el desarrollo de un método factible de ser introducido en los procesos de control de calidad y detección de fraudes en la industria vitivinícola debido a su versatilidad, sencillez, rapidez y, principalmente bajo coste.

IV.3.3. RESULTADOS: CLASIFICACIÓN DE VINOS POR SU PERFIL ELECTROFORÉTICO

IV.3.3.1. INTRODUCCIÓN

La creación del modelo de clasificación a partir del índice electroquímico de los vinos medido a diferentes potenciales de trabajo, ha sugerido la posibilidad de repetir los estudios estadísticos aplicados en el apartado anterior empleando los datos obtenidos al realizar la separación electroforética de las mismas muestras utilizadas. Con la separación electroforética se obtiene además información sobre la distribución polifenólica de los vinos, la cual puede presentar más diferencias que el parámetro relacionado con el contenido de compuestos fenólicos total.

La principal ventaja que presenta la metodología propuesta anteriormente es la viabilidad para realizar una separación de este tipo sin necesidad de llevar a cabo un tratamiento de muestra. La gran mayoría de errores de tipo sistemático o aleatorio que se producen durante todo el proceso analítico provienen principalmente del tratamiento previo de la muestra y/o proceso de extracción del analito de interés. Eliminando este paso, además de eliminar una buena parte de dichos errores, se evita una posible degradación de parte de los compuestos a analizar en este caso en particular.

IV.3.3.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Además del estudio electroforético se han medido los parámetros químicos típicos de caracterización de los vinos. Los resultados mostrados en la tabla 52 muestran que estos parámetros son independientes del tipo de uva que aparece como principal en la composición de los vinos empleados. Así, se han medido el grado alcohólico, acidez total, pH y contenido en sulfitos, siguiendo los procedimientos oficiales recogidos en la Oficina Internacional de la Viña y el Vino (OIV) y que se han descrito en la parte experimental de esta Tesis. La acidez total se expresa en equivalentes de ácido tartárico ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y el contenido en sulfitos viene dado en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabla 52. Parámetros químicos de caracterización de vinos

Muestra	Uva	Número	Grado alcohólico	pH	Sulfitos	Acidez total
Valpincia	Verdejo	V1	13,0	3,5	158,4	5,9
Valpincia B2	Verdejo	V2	13,0	3,3	124,8	5,7
Montespina	Verdejo	V3	13,0	3,6	142,4	5,9
Palacio de Bornos	Verdejo	V4	13,5	3,3	161,6	5,9
Fray Germán	Verdejo	V5	12,5	3,3	88,00	5,6
Gorgorito	Verdejo	6V	13,0	3,2	80,00	5,7
Camino de la Dehesa	Verdejo	V7	13,0	3,3	126,4	5,9
Emina B1	Verdejo	V8	13,0	3,3	121,6	5,7
Emina B2	Verdejo	V9	13,0	3,2	144,0	5,4
Mayor de Castilla	Verdejo	V10	13,5	3,4	152,0	5,6
Blume	Verdejo	V11	12,0	3,1	166,4	6,1
Cuatro Rayas	Verdejo	V12	12,0	3,1	156,8	6,9
Señorio Real	Verdejo	V13	12,5	3,3	184,0	6,1
Marqués de Riscal B1	Verdejo	V14	12,8	3,2	148,8	5,3
Marqués de Riscal B2	Verdejo	V15	12,8	3,1	142,4	5,8
Navesur	Verdejo	V16	12,5	3,2	148,8	5,7
Veliterra	Verdejo	V17	12,0	3,4	112,0	6,1
Peñasol	Airén	A1	11,0	3,4	107,2	5,2
Fuente del Ritmo B1	Airén	A2	11,5	3,3	78,40	6,0
Fuente del Ritmo B2	Airén	A3	11,5	3,3	76,80	5,8
Soliera B1	Airén	A4	11,0	2,8	115,2	5,2
Soliera B2	Airén	A5	11,0	3,0	116,8	5,3
Castillo Delfos B1	Airén	A6	12,0	3,1	108,8	5,1
Castillo Delfos B2	Airén	A7	12,0	3,0	110,4	5,1
Viña Albali	Airén	A8	11,5	3,0	126,4	5,1
Castillo de Menara	Airén	A9	12,0	3,0	113,6	5,8
Cepa Ineo	Airén	A10	12,0	3,0	134,4	5,7
Cerro de los Pastores B1	Airén	A11	12,0	3,2	116,8	5,2
Cerro de los Pastores B2	Airén	A12	12,0	3,1	126,4	5,5
Cerro de los Pastores B3	Airén	A13	12,0	3,1	131,2	5,5
Batuta B1	Airén	A14	11,5	3,2	105,6	5,7
Batuta B2	Airén	A15	11,5	3,1	102,4	5,8
Calle Real	Airén	A16	11,0	3,1	158,4	5,7

IV.3.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevó a cabo el análisis de la muestra de vino empleando las condiciones de separación y detección óptimas descritas en el Apartado IV.2.2. A partir de los perfiles electroforéticos obtenidos se ha podido identificar con fiabilidad la quercetina y los ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico, y gálico mientras el ácido sinápico no se ha detectado en ninguna muestra. Tal como

se observa en la figura 70, correspondiente a una muestra de Castillo Delfos, el *t*-resveratrol y la (+)-catequina están en zonas con elevada presencia de señales pertenecientes a compuestos sin identificar y con muy baja resolución entre las mismas.

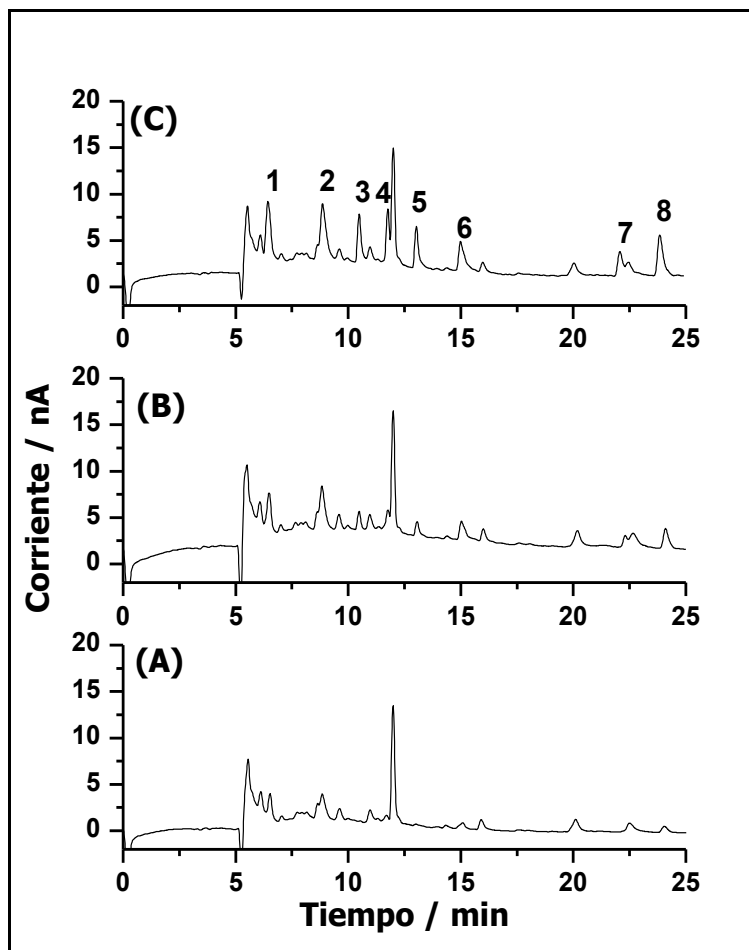


Figura 70. Separación electroforética de la muestra de vino Castillo Delfos sin dopar (A), y dopada con una concentración correspondiente a 20 μ M (B) y 50 μ M (C) de una mezcla de *t*-resveratrol (1), (+)-catequina (2), ácido sinápico (3), ácido ferúlico (4), ácido *p*-cumárico (5), quercetina (6), ácido cafeico (7) y ácido gálico (8)

La ionización del *t*-resveratrol al pH de trabajo y el tamaño de la molécula hacen que su movilidad electroforética sea pequeña por lo que migra a la velocidad que lo hace el flujo electroosmótico y como consecuencia se presenta en una zona de compromiso para su posible cuantificación. La identificación ha sido posible con la adición de analito a la muestra, pero la baja resolución con las señales de compuestos sin identificar conduce a errores importantes en la cuantificación. Lo mismo le ocurre a la (+)-catequina, a pesar de estar ionizada, su elevado tamaño hace que su velocidad electroforética sea baja y sea la electroosmótica la que tiene mayor influencia en su movilidad total, encontrándose también en una zona con un número elevado de señales y baja resolución.

El ácido *p*-cumárico, cuya presencia en vinos es habitualmente en baja concentración, ha sido detectado en 27 muestras pero sólo se ha podido cuantificar en cinco de ellas. El ácido cafeico

se ha encontrado en 25 muestras pero, debido al solapamiento de su señal con una correspondiente a un compuesto sin identificar, sólo se ha podido cuantificar en 14 de las 25 muestras que lo contienen. Las señales obtenidas para la quercetina y el ácido gálico han resultado relativamente elevadas y se han podido cuantificar ambos compuestos en 31 y 26 muestras respectivamente. Por último, el ácido ferúlico se ha detectado en todas las muestras de vinos analizados, sin embargo, su cuantificación no ha sido posible en algún caso debido al solapamiento de su señal con la correspondiente a un compuesto sin identificar que presenta la mayor señal encontrada en todas las muestras. En la tabla 53 se muestran los datos obtenidos para la concentración de cada compuesto:

Tabla 53. Concentración de los polifenoles en las muestras de vino, expresadas en mg/L de analito

Muestra	Ácido ferúlico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Quercetina	Ácido Cafeico	Ácido Gálico
V1	1,76±0,11	d.n.c.	3,36±0,24	d.n.c.	1,56±0,25
V2	1,57±0,12	d.n.c.	4,28±0,18	d.n.c.	1,37±0,08
V3	2,76±0,08	d.n.c.	3,13±0,03	3,37±0,09	5,51±0,15
V4	2,16±0,16	d.n.c.	2,60±0,04	d.n.c.	1,48±0,05
V5	1,41±0,04	d.n.c.	4,35±0,07	2,75±0,37	4,71±0,05
V6	1,95±0,07	d.n.c.	4,72±0,39	d.n.c.	3,66±0,15
V7	2,15±0,04	d.n.c.	3,77±0,14	2,42±0,08	2,42±0,08
V8	2,36±0,12	d.n.c.	6,46±0,04	d.n.c.	d.n.c.
V9	2,70±0,02	1,18±0,16	5,04±0,00	d.n.c.	d.n.c.
V10	2,20±0,05	d.n.c.	3,32±0,13	2,51±0,04	2,43±0,06
V11	1,52±0,08	d.n.c.	5,88±0,10	d.n.c.	1,23±0,04
V12	d.n.c.	d.n.c.	3,42±0,06	3,26±0,16	2,10±0,01
V13	1,65±0,08	n.d.	3,27±0,17	2,62±0,13	5,65±0,08
V14	1,31±0,05	d.n.c.	5,09±0,04	d.n.c.	1,17±0,14
V15	1,44±0,04	d.n.c.	5,54±0,37	d.n.c.	1,25±0,02
V16	2,02±0,05	d.n.c.	2,98±0,06	2,48±0,06	3,35±0,05
V17	2,63±0,29	n. d.	1,62±0,10	d.n.c.	2,14±0,15
A1	n.d.	d.n.c.	2,23±0,13	d.n.c.	1,97±0,18
A2	d.n.c.	n.d.	2,28±0,17	n.d.	1,57±0,06
A3	d.n.c.	n.d.	2,35±0,67	n.d.	1,87±0,60
A4	d.n.c.	1,18±0,05	2,14±0,03	1,96±0,19	1,46±0,09
A5	d.n.c.	1,21±0,09	2,02±0,03	1,99±0,09	1,37±0,02
A6	d.n.c.	d.n.c.	d.n.c.	n.d.	d.n.c.
A7	d.n.c.	d.n.c.	d.n.c.	n.d.	d.n.c.
A8	n.d.	d.n.c.	1,89±0,05	d.n.c.	d.n.c.
A9	d.n.c.	n.d.	1,97±0,05	n.d.	d.n.c.
A10	d.n.c.	n.d.	1,92±0,05	n.d.	d.n.c.
A11	d.n.c.	1,80±0,11	2,18±0,14	3,71±0,09	2,04±0,16
A12	d.n.c.	d.n.c.	2,23±0,15	d.n.c.	1,33±0,03
A13	d.n.c.	d.n.c.	2,28±0,07	d.n.c.	1,29±0,02
A14	1,55±0,02	d.n.c.	1,78±0,09	n.d.	1,92±0,04
A15	1,65±0,15	d.n.c.	1,65±0,12	n.d.	1,93±0,07
A16	d.n.c.	2,87±0,22	2,32±0,08	1,97±0,05	2,61±0,05

En general, en la tabla se observa que el contenido polifenólico es superior para las muestras de vino con variedad de uva Verdejo. Estos datos no dan la misma información que los correspondientes al estudio de clasificación con el índice electroquímico relacionado con el contenido total en polifenoles, en la cual se obtenía que este era más elevado para los vinos con uvas tipo Airén. En realidad las respuestas analíticas son diferentes: en el primer estudio se obtiene un valor que se relaciona con una concentración total mientras que en este estudio, se obtiene una separación de compuestos y los valores de concentración aquí son relativos a los citados compuestos. Esto sugiere la posibilidad de una distribución diferente en la composición de compuestos polifenólicos en función del tipo de uva que se presenta en los vinos.

Se ha realizado un estudio de comparación de los electroferogramas correspondientes a cada tipo de uva separándolos en las diferentes regiones características que poseen para distinguir la distribución de polifenoles de cada variedad de uva, tal y como se muestra en la figura 71.

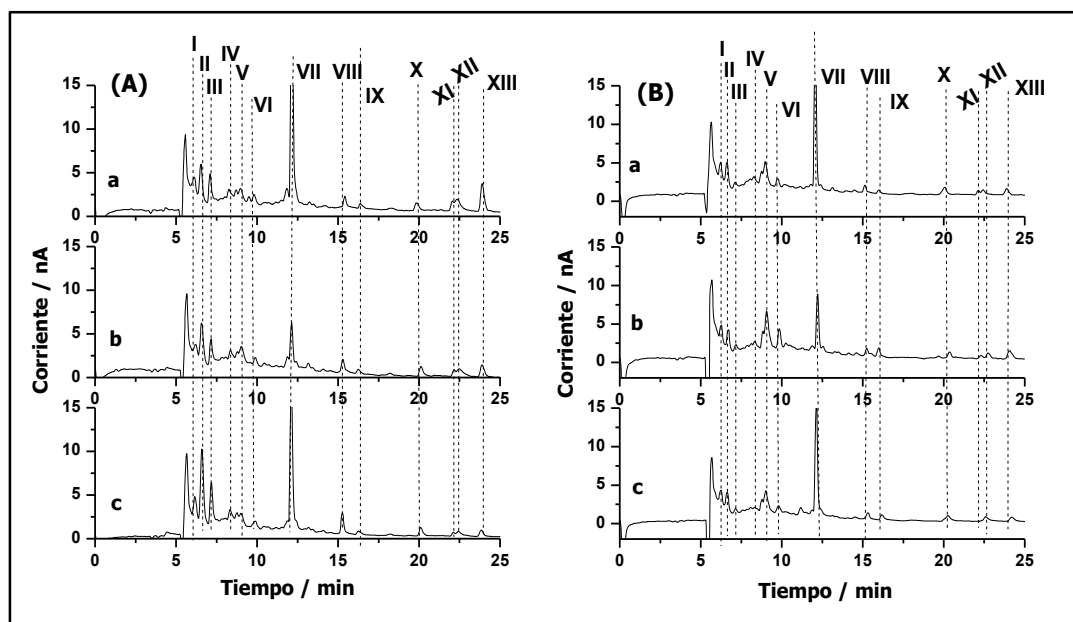


Figura 71. Separaciones electroforéticas de tres vinos con variedad de uva tipo Verdejo (A) cuyos electroferogramas pertenecen a Montespina (a), Camino de la Dehesa (b) y Marqués de Riscal (c) y tres vinos con variedad de uva tipo Airén (B) cuyas muestras son Cerro de los Pastores (a), Peñasol (b) y Cepa Ineo (c)

Tal como se observa en el ejemplo de la figura 71 para seis muestras de vino se identifican trece picos que coinciden en todas las muestras estudiadas. El valor de la intensidad de corriente para cada pico, en nA, se ha tomado como una variable y en primer lugar se ha realizado el estudio del poder discriminatorio de cada una. Para ello se ha utilizado el test t de Student, en el que se han comparado las medias obtenidas para cada pico y en cada una de las dos variedades de uva que componen los vinos. El test t ha mostrado diferencias para nueve de las trece medias correspondientes a los picos identificados. Además, se han utilizado los pesos de Fisher para determinar qué variables presentan mayor poder discriminante entre las muestras y se ha obtenido que tres picos, el III, V y VIII, parecen ser los que influyen principalmente en las diferencias entre los dos grupos de vinos (valores elevados, >1). Por otro lado, los picos VII, X y XII, con valores para los pesos de Fisher próximos a cero parecen

ser irrelevantes. En la tabla 54 se recoge el resumen de estos resultados, en donde *SD* es la desviación estándar de la media y *max* y *min* son los valores máximo y mínimo respectivamente de cada columna de datos.

Como consecuencia de estos resultados, se ha creído más adecuado la aplicación de técnicas multivariantes con el objetivo de crear un posible modelo de clasificación de muestras Verdejo y Airén desconocidas en función del perfil electroforético que presenten.

Tabla 54. Valores de las medias de las intensidades de pico (nA), p-Valor y pesos de Fisher para cada pico correspondiente a cada grupo de muestras de las variedades de uva Verdejo y Airén

	Pico I	Pico II	Pico III	Pico IV	Pico V	Pico VI	Pico VII	Pico VIII	Pico IX	Pico X	Pico XI	Pico XII	Pico XIII
Verdejo	Media	1,489	4,362	2,719	0,774	1,165	0,801	14,125	1,751	0,399	0,786	0,669	1,458
	SD	0,453	1,967	0,984	0,155	0,437	0,166	10,29	0,479	0,151	0,209	0,223	0,953
	Max	2,106	8,360	4,114	1,103	2,366	1,221	31,941	2,693	0,572	1,138	1,083	3,323
	Min	0,772	1,020	0,987	0,586	0,621	0,591	1,781	1,083	0,000	0,382	0,393	0,470
	Mediana	1,337	4,100	2,706	0,745	1,054	0,820	12,621	1,678	0,445	0,751	0,570	1,077
Airén	1 ^{er} cuartil	1,215	3,857	2,464	0,659	0,905	0,650	4,670	1,378	0,359	0,652	0,507	0,733
	3 ^{er} cuartil	1,936	4,833	3,242	0,825	1,292	0,871	22,349	2,105	0,496	0,954	0,816	2,013
	Media	1,81	2,779	0,651	0,481	3,053	1,16	9,302	0,824	0,911	0,914	0,331	0,856
	SD	0,546	1,091	0,183	0,228	0,822	0,588	6,133	0,133	0,398	0,220	0,271	0,238
	Max	2,682	4,586	1,134	0,755	4,833	2,446	18,737	0,980	1,681	1,317	0,833	1,200
Test t Student	Min	0,852	1,190	0,442	0,000	1,689	0,39	1,015	0,547	0,370	0,591	0,000	0,510
	Mediana	1,787	2,448	0,641	0,484	2,843	1,005	10,506	0,843	0,859	0,887	0,250	0,807
	1 ^{er} cuartil	1,579	2,186	0,514	0,430	2,613	0,862	3,725	0,765	0,636	0,761	0,100	0,642
	3 ^{er} cuartil	1,994	3,406	0,737	0,630	3,632	1,193	14,004	0,930	1,138	1,058	0,533	1,113
	p-valores	0,085	0,010	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,037	0,127	<0,0001	0,0002	0,106	0,0007	0,025
Peso de Fisher		0,110	0,260	2,209	0,614	2,238	0,189	0,085	1,800	0,794	0,096	0,501	0,195

IV.3.3.2.1. Análisis de clúster

En primer lugar se ha empleado un análisis de clúster que realiza una primera clasificación de un grupo de muestras en función de las variables. En este trabajo se ha utilizado el método de agrupación de Ward⁷ y las muestras se han clasificado en función de la distancia Euclídea a la que se encuentran con respecto de sus centroides (clasificación de tipo jerárquica). De este cálculo se obtiene una representación gráfica en forma de dendrograma como el que se muestra en la figura 72 en el cual se observa que para una disimilitud superior a 30 se obtienen dos clases, una de ellas corresponde con la variedad de uva tipo Airén y la otra con la variedad Verdejo.

Con el análisis de clúster, además de predecir dos clases dentro de las muestras, se confirma el poder discriminatorio de las variables calculado con los pesos de Fisher.

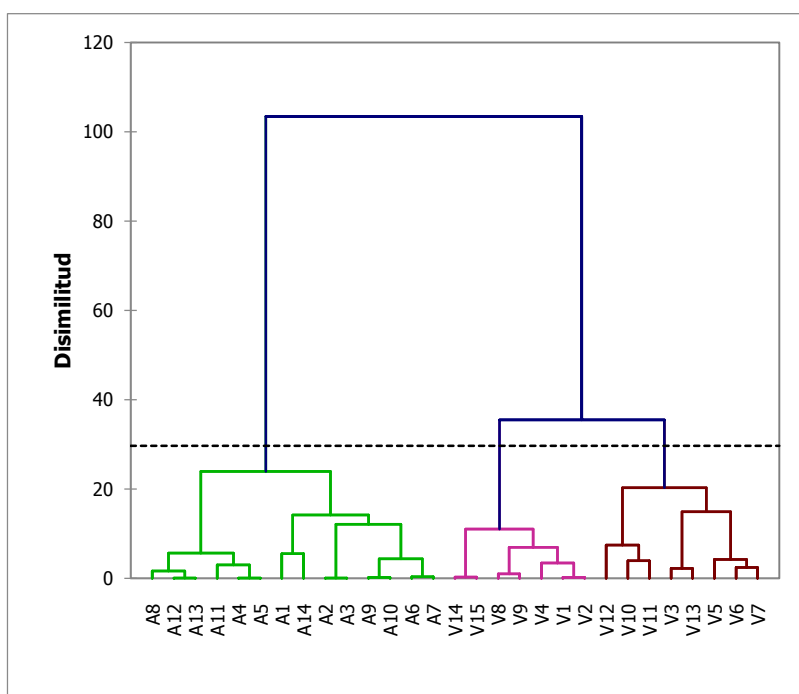


Figura 72. Dendrograma construido con todas las variables empleadas en el estudio

IV.3.3.2.2. Análisis de componentes principales

Los resultados obtenidos del análisis de clúster, hacen necesario la realización de un análisis de componentes principales, mediante el cual se puede predecir qué variables son imprescindibles y cuales irrelevantes a la hora de la asignación de una muestra desconocida a un grupo u otro. De él se obtiene, por tanto, qué variables es necesario medir y tener en cuenta. Además, permite la visualización de las muestras en un espacio de dimensiones reducidas que engloba el máximo de información de la variabilidad de los resultados, en el cual se pueden definir posibles grupos ocultos presentes en la matriz de datos original.

Los pesos de Fisher han mostrado la irrelevancia de algunas variables en el poder de discriminación entre muestras y por ello, el análisis se ha repetido tres veces. En primer lugar se han introducido todas las variables y la matriz de correlación de Pearson ha dado como resultado una serie de correlaciones importantes entre variables, dentro de las cuales cabe destacar las que se producen entre los picos II y III así como entre II y VIII.

El componente principal 1 tiene un valor correspondiente a 4,8 sobre un total de 13 (trece variables), lo que equivale a una varianza explicada del 36,9%. Para explicar un 85% de la variabilidad de los resultados es necesario utilizar los cuatro primeros factores principales (resultados en la tabla 55). Los vectores propios de cada variable en cada uno de los componentes principales, mostrados en la tabla 56, son los correspondientes valores que toman los coeficientes de las variables en las combinaciones lineales que forman cada uno de estos componentes. Por otro lado, no todas las variables toman el mismo peso en un mismo componente y así, de la correlación entre variables y componentes, se ha concluido que los picos V y IX tienen una correlación significativa con el factor 1, mientras los picos III y IV tienen la misma pero de forma negativa. Los picos I y II presentan importante correlación positiva con el factor 2 y el pico XIII con el 3.

Tabla 55. Valor propio, porcentaje de varianza explicada y varianza acumulada para cada factor

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13
Valor propio	4,801	2,410	1,728	1,349	0,873	0,607	0,439	0,280	0,207	0,125	0,080	0,072	0,029
Variabilidad (%)	36,933	18,537	13,296	10,376	6,713	4,670	3,374	2,153	1,592	0,960	0,619	0,558	0,220
% acumulado	36,933	55,470	68,766	79,142	85,855	90,525	93,899	96,052	97,644	98,604	99,222	99,780	100,000

Tabla 56. Vectores propios

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13
Pico I	0,119	0,498	-0,190	0,194	-0,023	0,205	0,566	0,102	0,487	-0,078	0,044	-0,068	-0,202
Pico II	-0,273	0,428	-0,267	-0,088	-0,046	-0,006	0,084	0,278	-0,344	0,143	0,217	-0,073	0,622
Pico III	-0,379	0,251	-0,025	-0,220	-0,035	-0,231	-0,028	0,096	-0,326	-0,411	0,189	-0,136	-0,592
Pico IV	-0,323	0,316	0,026	0,315	0,093	0,169	-0,262	-0,188	-0,097	0,636	-0,208	-0,053	-0,309
Pico V	0,373	0,147	-0,019	0,369	-0,145	0,039	-0,013	-0,197	-0,375	-0,036	0,439	0,544	-0,103
Pico VI	0,236	0,355	0,075	0,286	-0,260	-0,502	-0,379	-0,196	0,175	-0,189	-0,086	-0,352	0,175
Pico VII	-0,183	-0,005	0,109	0,418	0,774	-0,276	0,026	0,125	0,057	-0,212	0,011	0,159	0,119
Pico VIII	-0,381	0,044	-0,217	-0,168	-0,212	-0,279	-0,194	-0,043	0,476	0,036	0,019	0,621	0,033
Pico IX	0,391	0,124	0,051	-0,091	0,005	-0,217	-0,150	0,751	-0,057	0,228	-0,242	0,182	-0,199
Pico X	0,142	0,378	0,195	-0,331	0,278	0,511	-0,490	-0,031	0,159	-0,253	0,074	0,094	0,077
Pico XI	-0,292	-0,009	0,298	0,380	-0,387	0,313	0,010	0,235	-0,115	-0,380	-0,421	0,173	0,120
Pico XII	0,055	0,308	0,502	-0,348	0,061	-0,247	0,397	-0,322	-0,165	0,088	-0,324	0,231	0,099
Pico XIII	-0,170	-0,059	0,667	0,051	-0,154	-0,034	0,030	0,222	0,241	0,221	0,570	-0,113	0,014

Las coordenadas que presentan los objetos en función de los factores principales permite la representación de los mismos en un espacio en el cual las trece variables, que antes representaban un eje cada una, se recogen a lo largo de dos que las engloban a todas. Los factores representan a cada variable con mayor o menor importancia en función de la carga factorial o correlación que tengan con cada una. Si las variables de mayor influencia en los factores presentan además elevado poder discriminatorio entre las muestras deberían observarse grupos en función del valor que tienen para las mismas. Del primer análisis de pesos de Fisher, se ha determinado que las variables con mayor poder discriminante, es decir, mayor capacidad para distinguir grupos, eran los picos III, V y VIII. Dichos picos, además de los picos IV y IX presentan una elevada carga factorial con el factor 1.

Por ello, se han realizado diferentes representaciones con los cuatro primeros componentes principales en las cuales se ha mantenido siempre el PC 1 y se ha variado el otro eje con los otros tres componentes (Figura 73). Las muestras se distribuyen en el espacio siempre en la dirección del componente 1, en función de si presentan mayor valor (Airén) o menor (Verdejo) del mismo. Como ya se ha dicho, este componente está influido de forma significativa por los picos III, IV, V, VIII y IX. Además, estas correlaciones, son positivas con los picos V y IX y negativas con el resto. Así, la distribución de muestras sugiere pensar que los vinos en cuya composición principal está la uva de variedad Airén, tendrán una mayor concentración de los compuestos responsables de las señales de los picos V y IX y menor concentración de los compuestos de los picos III, IV y VIII, mientras que para los vinos con uva principal de la variedad de tipo Verdejo sucede lo contrario.

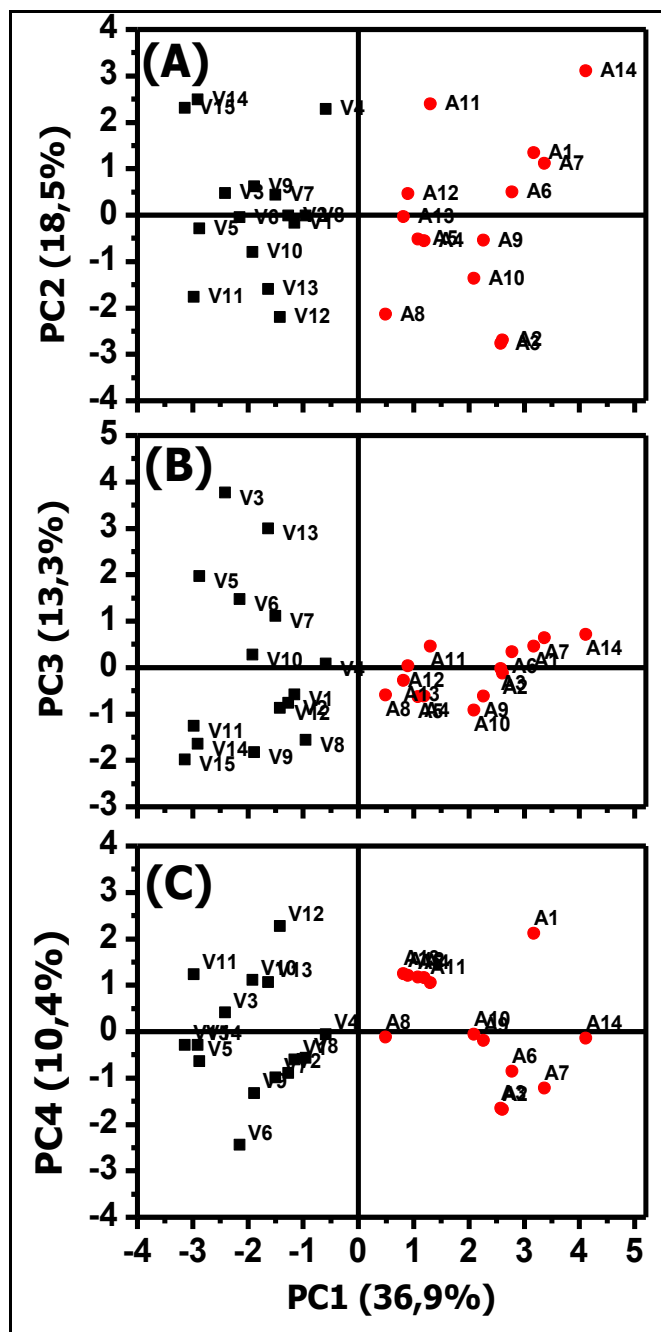


Figura 73. Representación de los objetos (scores) en los espacios de los componentes principales PC1 y PC2 (A), PC1 y PC3 (B), PC1 y PC4 (C)

Se ha repetido el análisis reduciendo la entrada de variables a 9, eliminando aquellas que no presentan especial relevancia en la discriminación intergrupar, en este caso los picos I, VI, VII y X. Los resultados obtenidos con respecto a la correlaciones entre variables y entre variables y componentes, se han mantenido. Sin embargo, el tipo de correlación ha variado y en el pico V ahora presenta correlación negativa con el componente 1, mientras que la del III y VIII es positiva. Es lógico por tanto que la representación sea igual que la mostrada en la figura 73

pero de signo contrario. Posteriormente se ha realizado una tercera repetición empleando solamente seis variables correspondientes a los picos III, V, VIII, X, XII y XIII en el cual se han repetido los resultados obtenidos en el estudio con nueve variables. En la figura 74 se muestran los objetos en el espacio de los dos primeros componentes para el ensayo de 9 (A) y 6 (B) variables respectivamente.

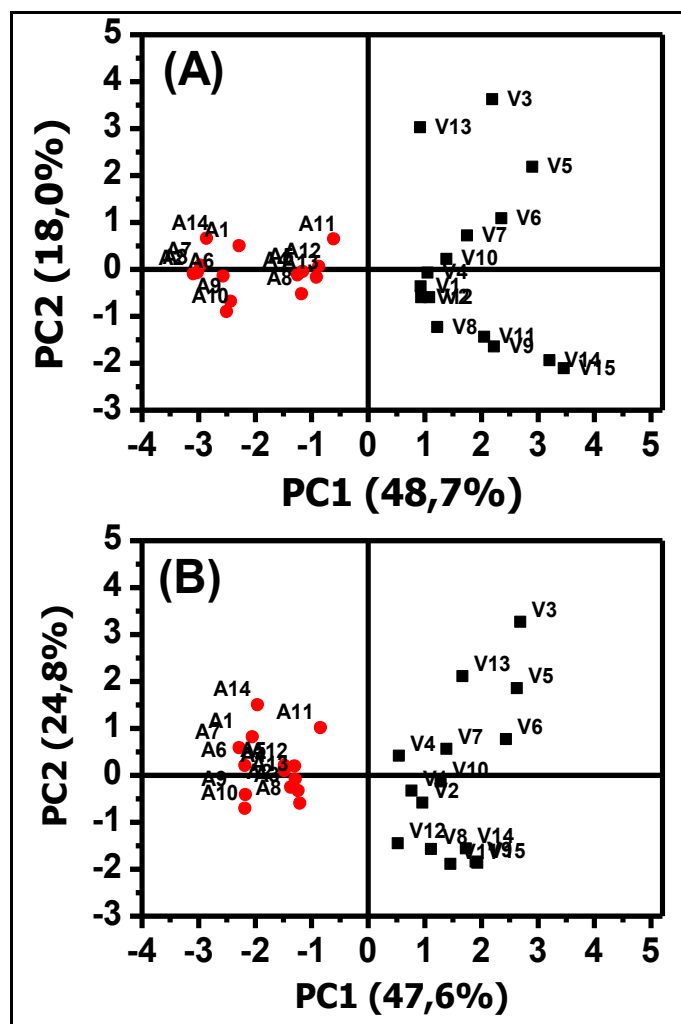


Figura 74. Representación de los objetos (scores) en el espacio de los dos primeros PC para el ensayo con 9 (A) y 6 (B) variables

La distribución de muestras en el espacio en la dirección del componente principal 1 ofrece la misma información a pesar de la situación aparentemente contraria de los grupos. La correlación negativa que presenta ahora por ejemplo el pico V, hace que las muestras de variedad de uva Airén, se sitúen en zonas con valores elevados de dicho pico, que ahora corresponde a la parte negativa del gráfico.

Con este análisis se ha demostrado que es factible eliminar algunas variables sin que el resultado final se vea afectado. Por tanto se hace innecesario tener en cuenta un número tan

elevado de señales si la misma información se obtiene empleando los picos II, III, IV, V, VIII, IX, XI, XII y XIII.

IV.3.3.2.3. Análisis discriminante

La posibilidad de desarrollar un modelo clasificatorio, que además sea capaz de predecir la clase de pertenencia de futuras muestras de origen desconocido a partir del valor que presentan para las señales antes indicadas, se ha estudiado utilizando el análisis discriminante.

De las conclusiones del análisis de componentes principales se ha determinado la posibilidad de trabajar con menos variables y por tanto, el análisis discriminante se ha realizado utilizando las 6 variables con mayor poder discriminante: picos III, IV, V, VIII, IX y XI. La matriz de datos con las muestras de vino forma un grupo denominado de entrenamiento, empleado en la creación del modelo. De las 33 muestras, cuatro de ellas han sido eliminadas de este grupo para formar el grupo de validación externo. Durante el desarrollo de la función discriminante, se emplea como método de validación interna el *leave-one-out*.

Descartados los posibles problemas de multicolinealidad entre variables se ha realizado la prueba de Box para la comparación de las matrices de covarianza intraclase. En la prueba se ha aceptado la hipótesis alternativa por lo que dichas matrices resultan diferentes. En este caso la función discriminante no es lineal y se trata de una función cuadrática en la que se emplean todas las variables antes indicadas. Los coeficientes para cada variable en la función canónica se muestran en la tabla 57:

Tabla 57. Valores para los coeficientes de las variables en la función discriminante

	F1
Intersección	-0,095
Pico III	1,137
Pico IV	0,441
Pico V	-1,727
Pico VIII	0,490
Pico IX	0,492
Pico XI	0,808

Las correlaciones entre la función discriminante y las seis variables utilizadas son elevadas, y la correlación múltiple, que toma un valor de 0,958, muy próximo a la unidad, es especialmente buena. La capacidad discriminante de la función, evaluada con el test de la Lambda de Wilks ha resultado elevada, con un valor de Lambda de Wilks próximo a cero (0,082).

Cuando se ha llevado a cabo la validación interna con la técnica *leave-one-out*, solamente se ha clasificado mal una muestra del grupo de variedad de uva Airén (tabla 58), por lo que el porcentaje de acierto del modelo asciende a un 96,5%. Además, para el grupo de validación externo se han clasificado bien todas las muestras dando como resultado un 100% de exactitud del método (tabla 59).

Tabla 58. Matriz de confusión de la validación cruzada utilizando el leave-one-out

de \ a	Airén	Verdejo	Total	% correcto
Airén	13	1	14	92,86%
Verdejo	0	15	15	100,00%
Total	13	16	29	96,55%

Tabla 59. Matriz de confusión para la validación externa

de \ a	Airén	Verdejo	Total	% correcto
Airén	2	0	2	100,00%
Verdejo	0	2	2	100,00%
Total	2	2	4	100,00%

Con la creación de este modelo se ha demostrado que, llevando a cabo la separación electroforética con detección amperométrica de una muestra de vino de blanco, que además no requiere tratamiento previo de la misma, se obtiene información suficiente relacionada con los tipos de uva estudiados y que además permite distinguir entre los vinos que contienen una y otra variedad de uva principalmente en su composición. Se ha demostrado la capacidad del mismo sensor para su utilización en dos técnicas diferentes, de las cuales se obtiene información distinta pero que, en los dos casos, ha servido para el desarrollo de métodos de análisis y posterior clasificación de muestras factible de ser introducido en los sistemas de control de calidad de la industria vitivinícola, debido principalmente a su robustez, sencillez y ausencia de tratamiento de muestra.

IV.3.4. BIBLIOGRAFÍA

1. S. Wold, "Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it?", Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 30, 109-115, 1995.
2. D. L. Massart, B. G. Vandeginste, L. M. C. Buydens, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, S. De Jong, "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A", Capítulo 1, Elsevier Science, New York, USA, 1997.
3. K. J. Siebert, "Chemometrics in Brewing – A Review", Journal of American Society Brewing Chemists, 59, 147-156, 2001.
4. M. Valcárcel, "Principios de Química Analítica", Capítulo 1, Springer-Verlag Ibérica S.A, 1999.
5. Y. Pomeranz, C. E. Meloan, "Food Analysis: Theory and practice", Capítulo 1, Aspen Publishers, 3rd Edition, 2000.
6. G. Ramis Ramos, M. C. García Álvares-Coque, "Quimiometría", Capítulo 6, Síntesis, Madrid, España, 2001.
7. D. Peña, "Análisis de datos multivariantes", Capítulo 8, Mc Grawhill, 2002.
8. J. N. Miller, J. C. Miller, "Estadística y Quimiometría para Química Analítica", Capítulo 8, Prentice Hall, 4^a edición, 2002.
9. B. G. Vandeginste, D. L. Massart, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B", Capítulo 33, Elsevier Amsterdam, Holland, 1998
10. M. Forina, S. Lanteri, C. Armanino, "Chemometrics in food chemistry", Capítulo 4, Springer-Verlag, Berlín Heidelberg, 1987.
11. R. Fisher, "The use of multiple measurements in taxonomic problems", Annals of Eugenics, 7, 179-188, 1936.
12. B. R. Kowalski, C. F. Bender, "Pattern recognition. A powerful approach to interpreting chemical data", Journal of the American Chemical Society, 94, 5632-5639, 1972.
13. M. Forina, G. Drava, R. Lead, "Chemometrics in Transparencies", Universidad de Génova, Génova, 1997.
14. B. R. Kowalski, "Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry", Capítulo 2, D. Reidel, 1983.
15. J. Zupan, J. Gasteiger, "Neural networks in chemistry and drug design", Capítulos 1, 2 y 3, 2nd edition, Wiley-VCH, 1999.
16. F. Rosenblatt, "The Perceptron, a perceiving and recognizing automaton", Project Para Report, 85-460-1, Cornell Aeronautical Laboratory (CAL), 1957.
17. E. Gómez-Plaza, R. Gil-Muñoz, J. M. López-Roca, A. Martínez, "Color and Phenolic Compounds of a Young red wine. Influence of wine-making techniques, storage temperature and length of storage time", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 736-741, 2000.
18. B. Fernández de Simón, T. Hernández, E. Cadahía, M. Dueñas, I. Estrella, "Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak Wood", European Food Research and Technology, 216, 150-156, 2003.
19. I. S. Arvanitoyannis, M. N. Katsota, E. P. Psarra, E. H. Soufleros, S. Kallithraka, "Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (chemometrics)", Trends in Food Science & Technology, 10, 321-336, 1999.

20. http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/DOP_RIOJA.Pliego_de_condiciones_tcm7-213459.pdf
21. G. E. P. Box, "*Some theorems on quadratic forms applied in the study of analysis of variance problems II. Effect of inequality of variance and of correlation of error in the two way classification*", Annals of Mathematical Statistics, 25, 484-498, 1954.
22. K. V. Mardia, J. T. Kent, J. M. Bibby, "*Multivariate Analysis*", Academic Press, London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco, 1979.

V. CONCLUSIONES

PRIMERA

Se ha demostrado que los electrodos modificados con nanotubos de carbono presentan una serie de ventajas frente a los GCE sin modificar que los hace idóneos para su aplicación en el análisis de compuestos fenólicos en muestras de vino. Entre ellas cabe destacar la elevada relación entre la intensidad de corriente del pico de oxidación del compuesto y la corriente capacitativa. La elevada superficie activa de este tipo de materiales origina este aumento de señal. Esta característica, además, es la responsable de que los fenómenos de pasivación típicos que los compuestos fenólicos provocan en la superficie de los electrodos de trabajo de tipo GCE tarden más en aparecer, dando lugar a un aumento de la estabilidad. Mediante voltamperometría cíclica se ha podido evaluar la respuesta electroquímica de ambos electrodos con compuestos polifenólicos y se ha comprobado que el inicio de la oxidación del compuesto se adelanta cuanto se trabaja con nanotubos de carbono. Este permite trabajar a potenciales menores dando lugar a un aumento en la selectividad del análisis.

SEGUNDA

Se ha trabajado con nanotubos de carbono dispersos en matrices acuosas y, para solventar el problema de solubilidad que presenta este material en agua se ha realizado un estudio de adición de un polímero catiónico. Con este estudio se ha demostrado la importancia de obtener una dispersión de nanotubos de carbono con una buena homogeneidad y estabilidad en el tiempo. De ello depende directamente el tipo de recubrimiento que se obtendrá en la superficie de electrodo y por tanto la reproducibilidad en la señal obtenida. Se ha comprobado que la polietilenimina es el polímero con el que se obtiene la dispersión en la que los nanotubos de carbono no forman grandes agregados y por tanto se origina un recubrimiento liso, fino y homogéneo en la superficie del GCE. En cambio, la presencia de grandes agregados da lugar a diferentes zonas de recubrimiento del GCE así como de la presencia de zonas sin recubrir que pueden originar una mezcla de respuestas o respuestas muy diferentes entre sí.

TERCERA

Se han comprobado las posibilidades de la detección electroquímica de compuestos polifenólicos, siendo los parámetros más importantes a tener en cuenta el pH, concentración y la fuerza iónica de la disolución tampón empleada como electrolito soporte. Se ha evaluado la respuesta de los electrodos en régimen hidrodinámico acoplando una celda electroquímica a un sistema de inyección en flujo (FIA) y se ha demostrado el aumento de intensidad de señal así como el aumento en la estabilidad de los electrodos modificados con respecto al GCE. Los parámetros más importantes a tener en cuenta han sido la velocidad de flujo y el potencial de detección trabajo. Así, mediante la obtención de los voltamperogramas hidrodinámicos con ambos electrodos se ha demostrado la mayor selectividad que se obtiene cuando se trabaja con nanotubos de carbono al reducir los potenciales de oxidación de los compuestos. Por ello es posible trabajar a dos potenciales de trabajo diferentes, estableciéndose así varios índices electroquímicos relacionados con diferentes fracciones de compuestos polifenólicos presentes en una muestra.

CUARTA

Se ha puesto de manifiesto la capacidad de la aplicación de la detección electroquímica como alternativa a la determinación de compuestos polifenólicos mediante los métodos espectrofotométricos oficiales. Para ello se ha demostrado la relación de los índices electroquímicos con la concentración de compuestos polifenólicos mediante estudios de correlación con resultados de ensayos espectrofotométricos. De la aplicación de estos métodos se obtiene el contenido en polifenoles totales, así como en determinados grupos de polifenoles (flavanoles y flavonoides). Debido a ello la mayor correlación entre resultados se presenta con el índice electroquímico obtenido al trabajar a potencial más elevado, puesto que el menor potencial está relacionado con una fracción menor de polifenoles que además, no pertenecen a los grupos citados.

QUINTA

Se ha demostrado la capacidad de la aplicación de la separación por electroforesis capilar en zona con detección electroquímica como alternativa a otros métodos de separación y detección de compuestos polifenólicos descritos en la bibliografía. Los parámetros más importantes a tener en cuenta han sido el pH, concentración y naturaleza de la disolución tampón. Se ha comprobado que el pH básico del tampón no afecta a la detección amperométrica de los analitos y que la adición de metanol a dicha disolución mejora la resolución entre señales. De la aplicación del método a muestras de vino blanco de diferentes tipos de uvas se ha obtenido un perfil electroforético con determinadas señales características de cada una de las dos variedades estudiadas.

SEXTA

Se ha demostrado que es posible crear dos modelos de clasificación de muestras de vino blanco de dos variedades de uva diferentes: uno de ellos emplea como variables de clasificación los índices electroquímicos obtenidos a tres potenciales de trabajo diferentes. El otro utiliza los valores de las señales del electroferograma, que son características de cada muestra de uva. Se ha comprobado que la utilización de diversas técnicas quimiométricas, tanto de clasificación no supervisada (análisis de clúster), reducción del espacio de variables (PCA) y clasificación supervisada (LDA), hacen posible la creación de dos modelos que diferencian en dos grupos los vinos que presentan en su composición una u otra de las dos variedades de uva estudiadas.

Con ello, el trabajo desarrollado a lo largo de esta Tesis supone el inicio de una investigación que debería continuarse con el objetivo de la introducción de estos dos tipos de análisis y modelos de clasificación en la industria vitivinícola. Indudablemente la extrapolación de estos métodos a otros tipos de vinos y/o alimentos permitiría el análisis y control de calidad de los compuestos polifenólicos de elevado interés actual y futuro. Las ventajas han sido ampliamente expuestas a lo largo de este trabajo y entre ellas es importante destacar que los dos métodos desarrollados, permiten dicho control de calidad así como la posible detección de fraudes de una forma rápida, sencilla y con un coste bajo.

VI. PUBLICACIONES DERIVADAS

